

CICLOPÉPTIDOS DIMÉRICOS PARA EL TRANSPORTE DE IONES

Máster en Química Avanzada

Facultad de Química

Trabajo Fin de Máster

Alberto Fuertes García

Julio 2014

Departamento de Química Orgánica y
Centro Singular de Investigaciones en Química Biológica y Materiales Moleculares
(CIQUS)

D. JUAN GRANJA GUILLÁN, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y D. MANUEL AMORÍN LÓPEZ, PROFESOR INTERINO (T3) DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INFORMAN: que la memoria adjunta titulada “Ciclopéptidos diméricos para el transporte de iones” que presenta Alberto Fuertes García para superar la asignatura *Traballo de Fin de Máster*, perteneciente al Máster en Química Avanzada, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica en el CIQUS y autorizamos su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide la presente autorización en Santiago de Compostela a 1 de julio de 2014.

Fdo: Prof. Juan Granja Guillán

Fdo: Prof. Manuel Amorín López

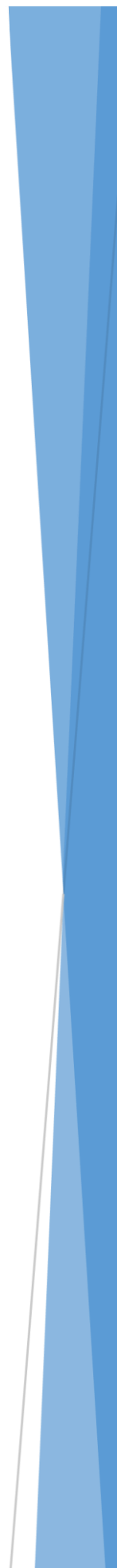
Índice

Abreviaturas	3
1. Introducción	5
1.1 Membranas biológicas y transporte	5
1.2 Nanotubos basados en el autoensamblaje de <i>D,L</i> - α -ciclopéptidos	10
1.3 Nanotubos basados en α,γ -ciclopéptidos	14
1.4 Aplicaciones de los nanotubos peptídicos: presente y futuro	17
2. Objetivos	24
3. Resultados y Discusión	28
3.1 Grupos protectores	28
3.1.1 Extremo amino-terminal: Grupo <i>Boc</i> (<i>tert</i> -butiloxicarbonilo)	28
3.1.2 Extremo amino-terminal: Grupo <i>Nosilo</i> (2-nitrobencenosulfonilo)	29
3.1.3 Protección del extremo C-terminal: grupo <i>éster metílico</i> (CO ₂ Me)	30
3.2 Formación del enlace peptídico: agentes de acoplamiento	31
3.3 Síntesis del aminoácido Boc- <i>L</i> - γ -Ace-OH [ácido (1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)- <i>cis</i> -4-amino-N- <i>tert</i> - butiloxicarbonilciclopenteno carboxílico]	32
3.4 N-funcionalización y protección del <i>L</i> - γ -Acp	35
3.4.1 N-Metilación	36
3.4.2 N-funcionalización con grupos voluminosos: propargilo y propil-azida	36
3.5 Síntesis peptídica	38
3.5.1 Alternativas: Fase sólida vs. Síntesis en disolución	38
3.5.2 Síntesis y estudio del α,γ -ciclotetrapéptido <i>ciclo</i>-[(<i>D</i>-Leu-^{3CN3}N-<i>L</i>-γ-Acp)₂] ..	40
3.5.3 Síntesis y estudio del α,γ -ciclooctapéptido <i>ciclo</i>-[(<i>D</i>-Leu-^{Me}N-<i>L</i>-γ-Acp-<i>D</i>-Leu- propargil N- <i>L</i> - γ -Acp) ₂]	43
3.6 Síntesis del dímero ciclopeptídico covalente mediante <i>Click Chemistry</i>	45
4. Conclusiones	48
5. Parte Experimental	50
Anexo: Datos espectroscópicos	62

Abreviaturas

δ	Desplazamiento químico
Aa	Aminoácido
γ -Acp	Ácido <i>cis</i> -3-aminociclopentano carboxílico
γ -Ace	Ácido <i>cis</i> -4-aminociclopent-2-eno carboxílico
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
(Boc) ₂ O	Anhídrido de <i>tert</i> -butiloxicarbonilo
3CN3	3-azidopropil
CP	Ciclopéptido
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DIEA	N,N-diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ESI	Ionización por electrospray
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
Leu	Leucina
[HR]MS	Espectrometría de masas [de alta resolución]
m/z	Relación masa/carga
N-HATU	N-óxido de N-[dimetilamino-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilmetilen]-N-metilmetanaminio hexafluorofosfato
N-HBTU	N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)-metilen]-N-metilmetanaminio hexafluorofosfato
N-TBTU	N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metil metanaminio tetrafluoroborato
PyAOP	Hexafluorofosfato de [(7-azabenzotriazol-1-il)oxi]tris-pirrolidino fosfonio
TFA	Ácido trifluoroacético

Capítulo 1: Introducción



1. Introducción

1.1 Membranas biológicas y transporte

“Buenas vallas hacen buenos vecinos”

Robert Frost, “Mending Wall”, en North of Boston, 1914.

Probablemente, uno de los factores que más impacto ha tenido en la evolución de la vida y la diferenciación de los organismos y especies fue la aparición de membranas biológicas. Las membranas permitieron llevar a cabo la compartimentalización dentro de los organismos pluricelulares mediante la aparición de diversos grupos de células diferenciadas e, incluso dentro de estas, ha sido posible la aparición de diferentes orgánulos membranosos como mitocondrias o cloroplastos. La existencia de partes diferenciadas dentro de organismos y células posibilita el desarrollo de funciones especializadas en cada una de ellas, haciendo que la maquinaria biológica funcione de manera más eficiente. En consecuencia los sistemas químicos compartimentalizados estaban más capacitados para la supervivencia en el medio en el que habitaban.

Las membranas en los organismos vivos son diferentes en cuanto a su composición química y su morfología, dependiendo en gran medida del organismo en el que se encuentren, del tipo de tejido o célula de la que forman parte y de las diferentes funciones que esta realice. No obstante, existen ciertas características básicas que se han conservado a lo largo de la evolución y que son comunes a todas ellas. Para empezar, en todos los tipos de membrana está presente una bicapa lipídica. Esta bicapa está formada por fosfolípidos, los cuales son moléculas anfipáticas que presentan una cabeza polar que contiene a los grupos fosfato y una componente apolar formada por dos ácidos grasos de cadena larga. Este carácter anfipático hace que en contacto con el agua, como en el caso de los organismos vivos, los fosfolípidos tiendan a formar agregados de tal manera que queden minimizadas las interacciones repulsivas (hidrofobicidad) entre las colas apolares y el agua del medio. Es así como aparecen las bicapas lipídicas (Figura 1), que se pueden considerar como un mosaico cuya parte exterior presenta los grupos fosfato y que alberga en su interior las colas hidrófobas de los ácidos grasos, que permanecen así protegidas del medio acuoso. La bicapa lipídica tiene un grosor de alrededor de 30 Å de grosor y es prácticamente impermeable a cualquier soluto polar, debido precisamente a la presencia de ese núcleo hidrocarbonado en su interior.¹

¹ D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman, New York, 2009.

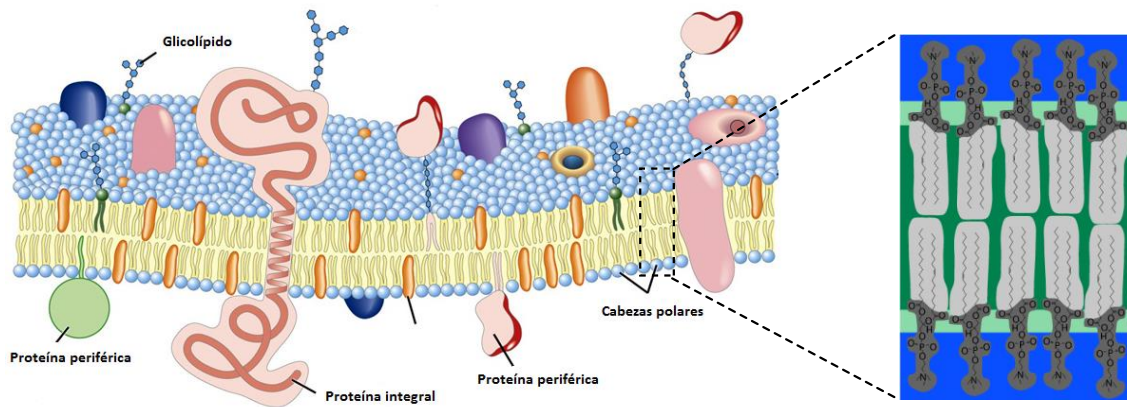


Figura 1. A la izquierda se muestra una representación esquemática de una membrana biológica con sus diferentes partes. A la derecha se puede observar la estructura química de la ampliación de la bicapa lipídica y los distintos niveles de hidratación que presenta cada parte, yendo desde la alta hidratación del exterior causada por la presencia de grupos fosfato cargados (azul) hasta el interior completamente deshidratado compuesto por colas hidrocarbonadas (verde oscuro).

El hecho de que las membranas no permitan el paso de moléculas polares hace que las células precisen de algún sistema que facilite el tránsito de analitos de un extremo a otro de la membrana, pudiendo así comunicarse con su entorno y también con otras células. Una de las soluciones que la vida ha encontrado para este problema pasa por la utilización de proteínas de membrana, que son otro de los componentes que están presentes en todas las células que han sido estudiadas.²

Aparte del propio transporte de analitos a través de las membranas, las proteínas que están insertadas en las bicapas lipídicas cumplen muchas más funciones biológicas como por ejemplo la homeostasis,³ la transducción de señales,⁴ la catálisis,⁵ la realización de la fotosíntesis,⁶ etc. No obstante, para el propósito de esta memoria sólo se abarcarán en esta introducción las proteínas con funciones relacionadas con el transporte de solutos de un lado a otro de la membrana.

En cuanto a su estructura, las proteínas integrales de membrana cuentan con una región de alto índice hidropático, es decir, alto carácter hidrofóbico, lo que les permite insertarse en la zona hidrocarbonada de las bicapas lipídicas dado el alto número de interacciones hidrofóbicas que se producen. Generalmente, estas regiones transmembrana están compuestas en su mayor parte por aminoácidos (Aas) de tipo apolar (leucina, valina, fenilalanina, etc.) y normalmente presentan una estructura secundaria de hélice α o de barril β (producida por la interacción de varias láminas β), dependiendo este factor en gran medida del tipo de transporte que la proteína de

² W. Stoekenius, D.M. Engelman, *J. Cell Biol.* **1969**, 42, 613-646.

³ Se conoce por **homeostasis** al conjunto de fenómenos de autorregulación, que conducen al mantenimiento de la constancia en la composición y propiedades del medio interno de un organismo (RAE). M.A. Herman, B.B. Kahn, *J. Clin. Invest.* **2006**, 116, 1767-1775.

⁴ S.M. Assmann, *Science* **2005**, 310, 71-73.

⁵ P.D. Boyer, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 66, 717-749.

⁶ Special issue, *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* **2007**, 1767 (6).

membrana lleve a cabo,⁷ como se explicará a continuación (Figura 2). Es también habitual la presencia de Aas cargados (arginina, glutamina, aspartato, etc.) en las regiones orientadas hacia el exterior de la bicapa con el fin de favorecer la interacción con el agua, mientras que en la interfase lípido-agua suelen encontrarse en una mayor proporción los Aas triptófano y tirosina⁸, los cuales pueden interaccionar por un lado con la zona apolar de la bicapa y por otro con el medio acuoso. Otra característica bastante habitual es que existan uno o varios dominios (cadenas peptídicas) transmembrana idénticos, haciendo que la mayoría de proteínas transmembrana transportadoras sean oligoméricas.

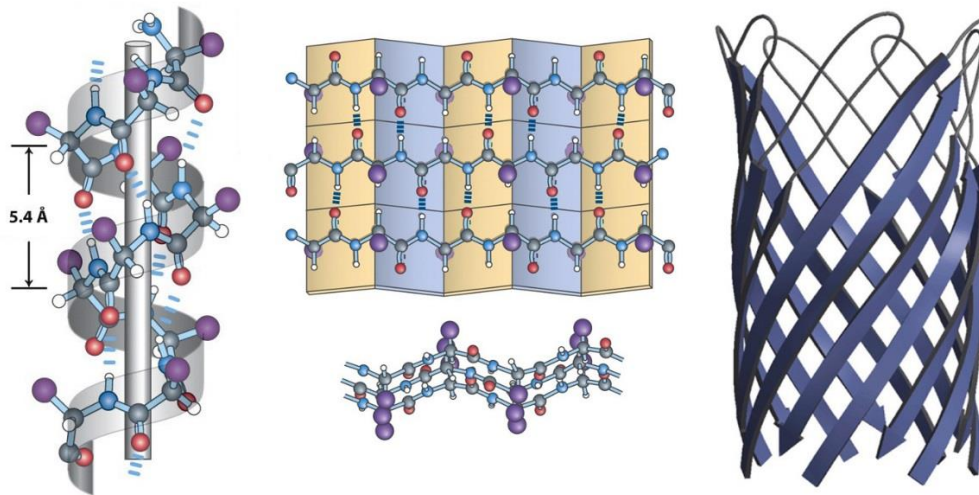


Figura 2. Diferentes estructuras secundarias de péptidos; a la izquierda se observa una hélice α , mientras que en el medio se pueden observar una visión superior (arriba) y lateral (abajo) de una lámina β antiparalela. En ambos casos se representa en azul los átomos de nitrógeno, en rojo los átomos de oxígeno y en violeta las cadenas laterales de los aminoácidos. A la derecha se puede observar un barril β , que deriva de la interacción de varias láminas β .

Las proteínas de membrana encargadas del transporte molecular pueden llevar a cabo dicha función de dos formas diferentes, denominadas transporte activo y transporte pasivo. El primer tipo se basa en el movimiento de un analito en contra de su gradiente electroquímico, por lo que se precisa un aporte de energía que posibilite vencer dicha barrera de potencial. Lo más habitual es que la hidrólisis de una o más moléculas de ATP, y la consiguiente energía generada, sea la fuerza impulsora que permita la translocación (transporte activo primario), aunque en ocasiones es el tránsito de otro soluto a favor de su gradiente lo que permite la entrada de otra molécula en la dirección electroquímicamente desfavorable (transporte activo secundario o cotransporte). En cuanto al transporte pasivo, las proteínas facilitan el paso a analitos que se mueven siempre a favor de su gradiente electroquímico pero que, en ausencia de un transportador apropiado, no podrían realizar el paso a través de la bicapa lipídica,

⁷ W.D. Stein, *Channels, Carriers, and Pumps: An Introduction to Membrane Transport*; Academic Press: San Diego, CA, 1990.

⁸ W-M. Yao, W. C. Wimley, K. Gawrisch, S. H. White, *Biochemistry* **1998**, 37, 14713–14718.

dada la alta energía del estado intermedio en el que el soluto ha perdido las moléculas de agua de su esfera de coordinación (Figura 3).⁹

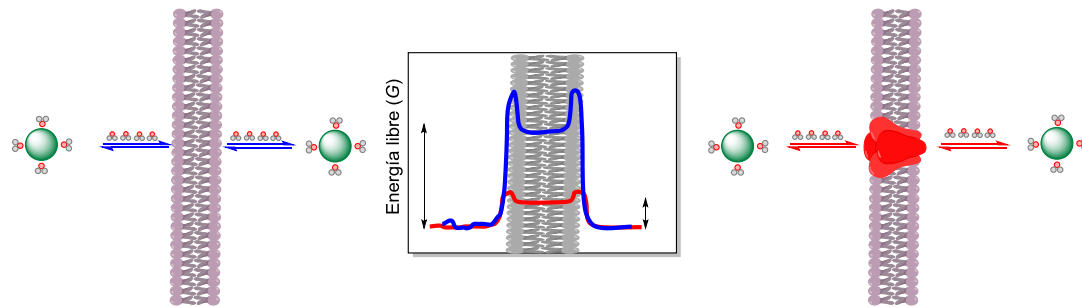


Figura 3. Esquema de la migración de solutos polares (esfera verde) a través de una bicapa lipídica. En la parte central se observa la comparación entre la energía libre necesaria para el transporte no facilitado (azul, izquierda) y el transporte promovido por una proteína transportadora (rojo, derecha).

A pesar de que no se puede llevar a cabo una descripción global de las proteínas que realizan cada tipo de transporte dada la gran variabilidad existente en los organismos vivos, si es posible observar ciertas diferencias entre las proteínas responsables del transporte activo y pasivo. Las proteínas que realizan el transporte activo, también conocidas como portadoras, catalizan el transporte a velocidades moderadas y son fácilmente saturables, mientras que las proteínas encargadas del transporte pasivo, comúnmente conocidas como canales, permiten el paso de solutos a velocidades varios órdenes de magnitud más elevadas que las portadoras. En cuanto a la afinidad que presentan hacia los analitos que transportan, es mayor en el caso de las portadoras. No obstante, la selectividad relativa en los canales transmembrana también es muy elevada, presentando valores mucho mayores que cualquier sistema de transporte artificial desarrollado hasta la fecha. A pesar de que el conocimiento que se tiene de la estructura tridimensional de estas proteínas integrales de membrana es limitado (dada la dificultad que entraña obtener estructuras cristalinas en este entorno), la mayoría de los ejemplos conocidos presentan en su estructura una región más estrecha de reconocimiento específica para un analito determinado, que generalmente se conoce como filtro de selectividad. En esta región se encuentran expuestos normalmente las cadenas laterales de aminoácidos polares y/o cargados, lo que hace que se puedan producir interacciones fuertes con ciertos analitos. Estas favorecen a nivel energético la selectividad de la proteína en cuestión. Algunos ejemplos representativos son los canales de K^+ ,¹⁰ Cl^- ,¹¹ glicerol¹² y, más recientemente, un canal de Na^+ bacteriano mutado para realizar transporte selectivo de Ca^{2+} .¹³

⁹ B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Incorporated, Sunderland, 3ª Edición, 2001.

¹⁰ D. Doyle, J. Cabral, R. Pfuetzner, A. Kuo, J. Gulbis, S. Cohen, B. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, 280, 69–77.

¹¹ R. Dutzler, E.B. Campbell, M- Cadene, B.T. Chait, R. MacKinnon, *Nature* **2002**, 415, 287-294.

¹² D. Fu, A. Libson, L.J.W. Miercke, C. Weitzman, P. Nollerts, J. Krucinski, R. M. Stroud, *Science* **2000**, 290, 480-486.

¹³ L. Tang, T.M. Gamal El-Din, J. Payandeh, G. Q. Martínez, T. M. Heard, T. Scheuer, N. Zheng, W. A. Catterall, *Nature* **2014**, 505, 56–61.

Dada la enorme relevancia de estas proteínas transportadoras a nivel biológico, existe un enorme interés por parte de la comunidad científica en desarrollar sistemas artificiales que puedan imitar las propiedades de los sistemas naturales, para aplicarlos en campos tan diversos como la biomedicina, la ciencia de materiales o nuevos sistemas de producción de energía. No obstante, dicha tarea no es ni mucho menos sencilla, ya que la naturaleza ha perfeccionado durante millones de años estas proteínas transportadoras, haciendo que las arquitecturas que provocan su preciso funcionamiento sean extremadamente complejas. A nivel sintético resulta prácticamente imposible tratar de construir átomo a átomo sistemas tan complejos y grandes como los existentes en los organismos vivos, por lo que generalmente se recurre a la química supramolecular para enfrentarse a la síntesis de este tipo de superestructuras. La aproximación supramolecular consiste en sintetizar moléculas relativamente pequeñas y sencillas que en las condiciones apropiadas sean capaces de formar sistemas mucho más complejos (conocidos como supramoléculas) mediante interacciones débiles reversibles (enlace por puente de hidrógeno, interacciones π , efecto hidrofóbico, fuerzas de Van der Waals). A pesar de que el proceso de ensamblaje es entrópicamente desfavorable, dado que aumenta el ordenamiento molecular, el balance termodinámico es favorable ya que la contribución entálpica del conjunto de las fuerzas débiles acaba teniendo relevancia por existir en un gran número.¹⁴

Con el fin de imitar las cavidades en forma cilíndrica que están presentes en la mayoría de canales biológicos, los químicos supramoleculares han desarrollado numerosos diseños diferentes que permiten la formación de nanotubos transportadores.¹⁵ Los ejemplos más relevantes abarcan desde el plegamiento de moléculas planas,¹⁶ la formación de hélices,¹⁷ el apilamiento de moléculas rígidas con forma de listón¹⁸ o cuña¹⁹ y finalmente el uso de moléculas cíclicas que puedan apilarse unas encima de otras²⁰ (Figura 4, de izquierda a derecha respectivamente).

¹⁴ Special issue, *Science* **2002**, 295, 2395-2421.

¹⁵ R.J. Brea, J.R. Granja, "Self-Assembly of Cyclic Peptides in Hydrogen-Bonded Nanotubes". En Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology; Marcel Dekker Inc.; **2004**, pp 3439-3457.

¹⁶ M.D. Watson, A. Fechtenkötter, K. Müllen, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 1267-1300.

¹⁷ R.B. Prince, L. Brunsveld, E.W. Meijer, J.S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 228-230.

¹⁸ N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 79-87.

¹⁹ V. Percec, J. Heck, D. Tomazos, F. Falkenberg, H. Blackwell, G. Ungar, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1993**, 1, 2799 - 2811.

²⁰ J. Montenegro, M.R. Ghadiri, J.R. Granja, *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 2955-2965.

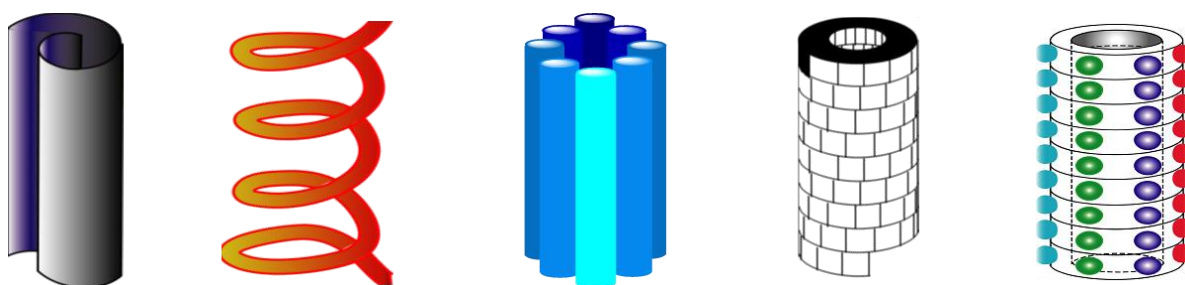


Figura 4. Aproximaciones supramoleculares hacia diferentes estructuras tubulares de dimensiones nanométricas.

1.2 Nanotubos basados en el autoensamblaje de *D,L*- α -ciclopéptidos

Dentro de la familia de moléculas cíclicas que son capaces de interaccionar supramolecularmente para dar nanotubos con cavidades cilíndricas, los ciclopéptidos (CPs) presentan una serie de ventajas que los hace particularmente interesantes a la hora de ser utilizados como transportadores sintéticos. En primer lugar, es posible controlar de manera muy precisa el diámetro de la cavidad interna del ciclo y, por consiguiente, de la estructura tubular que este determina. Al utilizarse un anillo de tipo polimérico (una cadena peptídica), el diámetro puede ser fácilmente alterado al añadir o quitar unidades de monómero (en este caso aminoácidos) de la secuencia del ciclo, mientras que las interacciones intermoleculares débiles mediante enlace de hidrógeno no se ven alteradas.

La historia de estas estructuras comienza en el año 1974, cuando De Santis realizó los primeros estudios teóricos sobre CPs compuestos por α -aminoácidos.²¹ En este trabajo postuló que el requisito para que se produjera el apilamiento entre los diferentes CPs era que estos pudieran adoptar una conformación plana. Según los cálculos teóricos esta era la única forma en la que los grupos carbonilo y amina que conforman el esqueleto peptídico quedasen en una disposición perpendicular al plano del anillo, de tal manera que la interacción intercíclica mediante enlace de hidrógeno fuese posible. Además, De Santis también determinó que para alcanzar la planaridad requerida, en el diseño deberían incluirse aminoácidos de quiralidad (*D* o *L*) alternante, con igual número de ambos. Otra particularidad de estas moléculas es que las cadenas laterales de los α -aminoácidos que componen el CP quedasen expuestas hacia el exterior de la cavidad, sin que afectase al proceso de autoensamblaje que se propaga en vertical por el plano del anillo. Así, aparece la posibilidad de generar estructuras con propiedades externas diferentes simplemente modificando los aminoácidos (y por consiguiente sus cadenas laterales) que componen el ciclopéptido (Figura 5).

²¹ P. De Santis, S. Morosetti, R. Rizzo, *Macromolecules* **1974**, 7, 52–58.

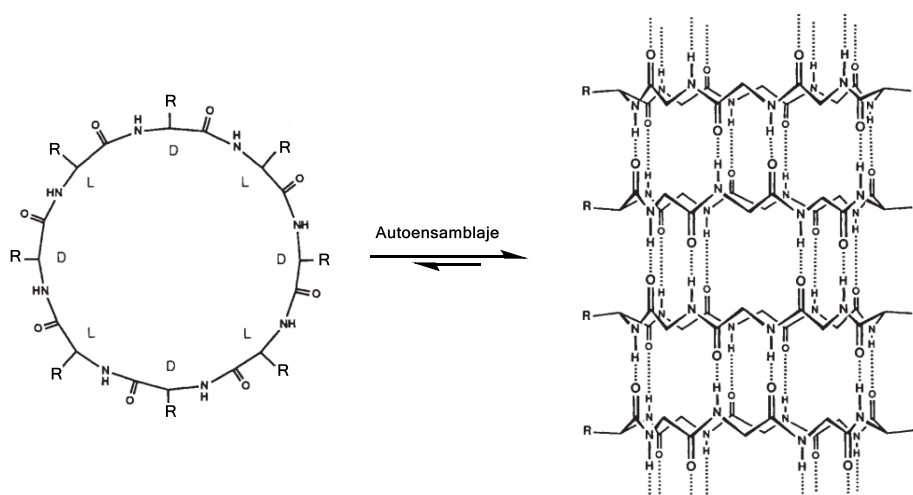


Figura 5. Apilamiento entre diferentes unidades ciclopeptídicas con conformación plana mediante enlaces de hidrógeno intercíclicos.

Después de los estudios llevados a cabo por De Santis, y dadas las dos grandes virtudes que se le suponían a esta nueva clase de moléculas, como era la capacidad de modificar con facilidad el diámetro interno del anillo peptídico y de poder modular sus propiedades exteriores simplemente seleccionando el tipo de aminoácidos que se incluían en la secuencia, se suscitó un gran interés en la comunidad científica alrededor de estas estructuras. Sin embargo, muchos de los esfuerzos realizados en el campo no fueron capaces de aportar evidencias experimentales de la existencia de estas estructuras, en gran parte debido a la escasa solubilidad que presentaban los ciclopeptidos empleados.²² No fue hasta la década de 1990, cuando Ghadiri consiguió obtener por primera vez nanotubos derivados del autoensamblaje de CPs formados por α -aminoácidos de quiralidad alternante (*D,L*- α -CPs). La estrategia se basaba en la utilización del octapéptido *ciclo*-[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala)₂], el cual era soluble en medio acuoso básico dada la ionización de la cadena lateral del residuo de ácido glutámico. A medida que se disminuía el pH de la disolución se observaba la aparición de cristales alargados, debidos al apilamiento entre varios CPs mediante enlaces de hidrógeno entre los residuos homocirales de ácido glutámico y también a las interacciones entre diferentes nanotubos causadas por la aparición de enlaces por puente de hidrógeno entre los residuos de glutamina (Figura 6).²³

²² L. Tomasic, G.P. Lorenzi, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1012-1016.

²³ M.R. Ghadiri, J.R. Granja, R.A. Milligan, D.E. McRee, N. Khazanovich, *Nature* **1993**, 366, 324-327.

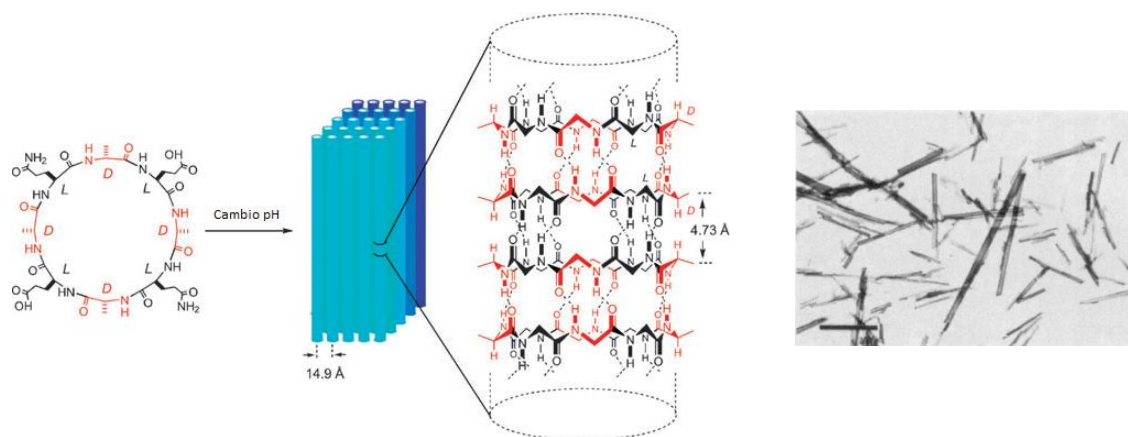


Figura 6. Izquierda: Estrategia seguida por Ghadiri para la obtención de los primeros nanotubos ciclopeptídicos. Derecha: Imagen de los nanotubos obtenida mediante microscopía electrónica (escala 1 μm).

Dichos cristales tenían unas dimensiones comprendidas entre 10 y 30 μm de largo frente a entre 100 y 500 nm de ancho, lo que evidenciaba la presencia de haces de nanotubos, también conocidos como *bundles*. Sin embargo, en ningún caso se pudo obtener un cristal que se pudiera resolver mediante difracción de rayos X. Dada la gran importancia que tendría la obtención de un monocristal para el estudio de estas supramoléculas, se llevaron a cabo otros diseños con el ciclododecapéptido *ciclo*-[(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)₃] esperando poder confirmar que era posible controlar el diámetro interno al aumentar el tamaño del ciclo y también con el fin de obtener un cristal que permitiera determinar su estructura mediante difracción de rayos X. A pesar de que sí se confirmó la primera hipótesis, los cristales obtenidos seguían siendo empaquetamientos de nanotubos, lo que imposibilitaba la resolución átomo a átomo mediante rayos X.²⁴

Dadas estas limitaciones y para poder así estudiar estos sistemas en profundidad, la estrategia llevada a cabo consistió en bloquear el crecimiento de los nanotubos a lo largo de su eje longitudinal. Puesto que la interacción que permite el ensamblaje era la formación de enlaces de hidrógeno entre un grupo N-H y un grupo carbonilo, la sustitución el átomo del hidrógeno por otro grupo alquílico evitaba el crecimiento de dicho nanotubo. La sustitución en todos los residuos homocirales de un ciclopeptido, bloqueaba el crecimiento del nanotubo a través de esa cara, por lo que se obtenía únicamente especies díméricas debido a la interacción por enlaces de hidrógeno de la cara sin sustituir. El primer cristal de un dímero se obtuvo del *ciclo*-[(L-Phe-D-MeN-Ala)₄] al cristalizarlo en disolventes apolares,²⁵ que permitió corroborar la planaridad del ciclo y la perpendicularidad de los grupos involucrados en el enlace amida que posibilitaban la interacción mediante enlaces de hidrógeno. Además, se observó la presencia de moléculas de agua desordenadas en el interior de la cavidad del dímero, lo que evidenciaba su carácter hidrofílico.

La N-alquilación de una de las caras determina una única forma posible de interacción entre los esqueletos peptídicos a través de una lámina β antiparalela con los residuos

²⁴ N. Khazanovich, J.R. Granja, R.A. Milligan, D.E. McRee, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6011–6012.

²⁵ T.D. Clark, J.M. Buriak, K. Kobayashi, M.P. Isler, D.E. McRee, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949–8962.

homoquirales enfrentados entre sí (Homodímero 1-1, Figura 7). Para explorar las diferentes posibilidades en la formación de láminas β , se realizaron estudios con una mezcla racémica del ciclooctapéptido anterior que mostraron la presencia de dos especies diméricas diferentes (Homodímeros **1-1** y **2-2**, que son enantiómeros entre sí, y Heterodímero **1-2**, Figura 7) en el espectro de ^1H RMN. En el caso de los homodímeros, la señal correspondiente a los protones del grupo N-H aparecía a $\delta = 8,73$ ppm, mientras que si se dejaba equilibrar la mezcla racémica también aparecía otra señal a $\delta = 8,49$ ppm. Esta última señal se corresponde con la señal del N-H del heterodímero, para el cual la interacción es de tipo lámina β paralela. El análisis de la estabilidad relativa de los dos tipos de dímero mediante la integración relativa de las señales anteriormente citadas (8,73 y 8,49 ppm) pudo determinar que la disposición antiparalela estaba más favorecida que la paralela, con una diferencia energética de 0,8 kcal/mol.²⁶

Estudios realizados posteriormente con *D,L*- α -ciclopéptidos N-metilados demostraron que los ciclohexapéptidos formaban dímeros que tenían una menor constante de asociación que sus homólogos de ocho aminoácidos, mientras que tetrámeros, decámeros o dodecámeros cíclicos no formaban dímeros puesto que no adoptaban con facilidad la conformación plana requerida para que pudieran apilarse.^{27,24}

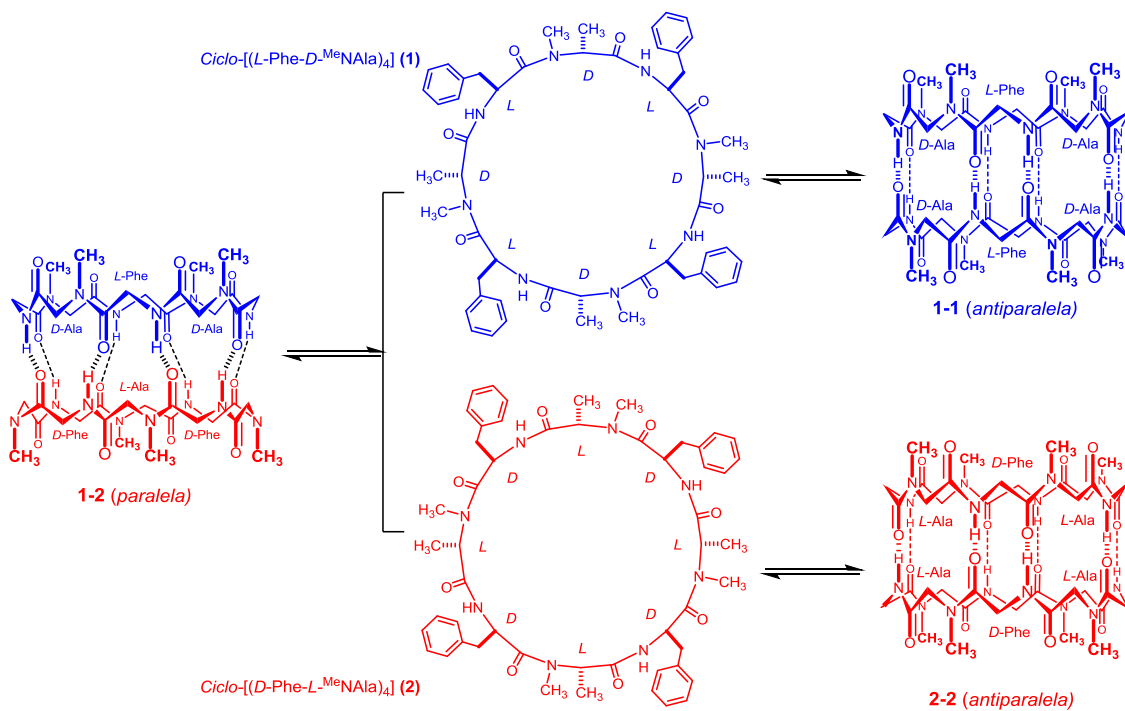


Figura 7. Estudio de formación de heterodímeros de *D,L*- α -ciclopéptidos a través de una interacción tipo lámina β paralela o de formación de homodímeros mediante una interacción tipo lámina β antiparalela mediante el bloqueo selectivo de una de una de las caras.

²⁶ K. Kobayashi, J.R. Granja, M.R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 95-98.

²⁷ X.C. Sun, G.P. Lorenzi, *Helv. Chem. Acta* **1994**, 77, 1520–1526.

1.3 Nanotubos basados en α,γ -ciclopéptidos

Una vez conocido en profundidad el proceso de ensamblaje molecular, el siguiente desafío para estos sistemas supramoleculares pasaba por su funcionalización. En este aspecto, quizás la funcionalización más relevante era la de la cavidad interna del CP, pensando sobre todo en aplicaciones en el campo de la química biológica, donde se esperaba que estas moléculas pudieran emular las anteriormente citadas propiedades de las proteínas transportadoras naturales.¹⁰⁻¹³ Sin embargo, el uso de *D,L*- α -ciclopéptidos entraña la limitación de que no es posible realizar modificaciones en el carbono α sin afectar al proceso de autoensamblaje conducente a la formación de la superestructura. Como solución a este inconveniente se pensó en la posibilidad de utilizar Aas que incluyeran más átomos de carbono entre el grupo amina y el grupo carboxílico que puedan ser modificados. El uso de β -Aas también impedía la funcionalización interna, ya que el grupo metileno adicional no expone ningún protón susceptible de ser sustituido que quede proyectados hacia el interior de la cavidad.²⁸ En el año 2003 en el grupo del profesor Juan Granja se desarrollaron diseños pioneros en los que se alternaba el uso del γ -Aa ácido *cis*-(1*R*,3*S*)-3-aminociclohexano carboxílico (*L*-Ach) con α -aminoácidos de configuración *D* para dar lugar a CPs que se autoensamblaban cuando adoptaban la conformación plana.²⁹ El hecho de recurrir a un aminoácido cíclico es esencial en estos diseños, ya que si se utilizasen moléculas más flexibles se produciría una variabilidad conformacional mucho mayor dificultando la planaridad del anillo. En el caso del Ach, al estar la orientación de ambas funcionalidades determinada por su presencia en el anillo, la restricción conformacional es casi total. Además, el hecho de introducir esta limitación, provoca una mayor preferencia por mantener la planaridad de todo el anillo, lo que beneficia enormemente el posterior paso del autoensamblaje. Dado que estos γ -Aas tienen un número impar de átomos entre el grupo amina y el grupo carbonilo, se pueden considerar equivalentes desde el punto de vista estructural a los α -Aas, por lo que los requerimientos para que el ciclo pueda adquirir la conformación plana son los mismos que para los *D,L*- α -ciclopéptidos, es decir, se debe respetar la alternancia de quiralidad entre cada pareja de aminoácidos contiguos (Figura 8).

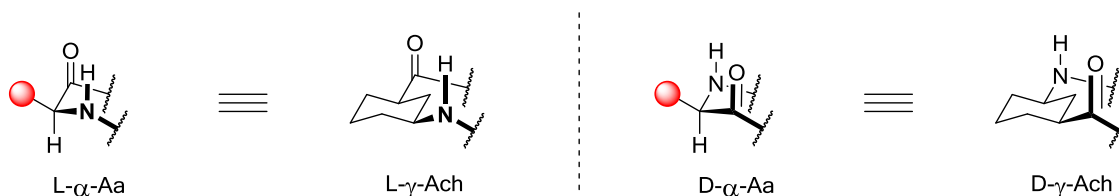


Figura 8. Comparativa entre α -Aas y γ -Aas. En rojo se muestra la posición de la cadena lateral de los α -Aas.

²⁸ T.D. Clark, L.K. Buehler, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651–656.

²⁹ M. Amorín, L. Castedo, J.R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844–2845.

Hay que tener en cuenta, que al haber dos tipos diferentes de residuos quirales (α -Aas y γ -Aas, respectivamente), también habrá dos caras que no son equivalentes; la cara que presenta el grupo amina y carbonilo de los α -Aas (cara α) y en la cara opuesta los grupos amina y carbonilo de los γ -Aas (cara γ) (Figura 9). A la hora de producirse el apilamiento, para que se dé la interacción de tipo lámina β antiparalela más favorable es preciso que las caras homólogas se enfrenten entre sí. Así, a la hora de formarse el nanotubo tras el autoensamblaje se observaría una sucesión de interacciones alternantes entre las caras iguales.

Los primeros experimentos llevados a cabo para estudiar el autoensamblaje de α,γ -ciclopéptidos se realizaron con dímeros de los ciclohexapéptidos *ciclo*-[(L-Ach-^{Me}N-D-Ala)₃] y *ciclo*-[(D-Phe-^{Me}N-L-Ach)₃] (Figura 9). Estos péptidos alternaban el patrón de metilación, situándose sobre los α -Aas en el primer caso y los γ -Aas en el segundo. Así, el primero presentaba una interacción de tipo γ - γ por tener la cara α bloqueada y el segundo exactamente al contrario. Por lo tanto, este estudio del proceso de dimerización permitió cuantificar las constantes de asociación (K_a) derivadas de cada tipo de interacción. Para el caso de la interacción γ - γ los valores de K_a resultaron estar alrededor de 10^2 M^{-1} , los cuales eran similares a los obtenidos con *D,L*- α -ciclooctapeptidos.²⁵ Sin embargo, sorprendentemente los valores obtenidos para la interacción por la cara α presentaban valores mucho mayores, con K_a alrededor de 10^5 .

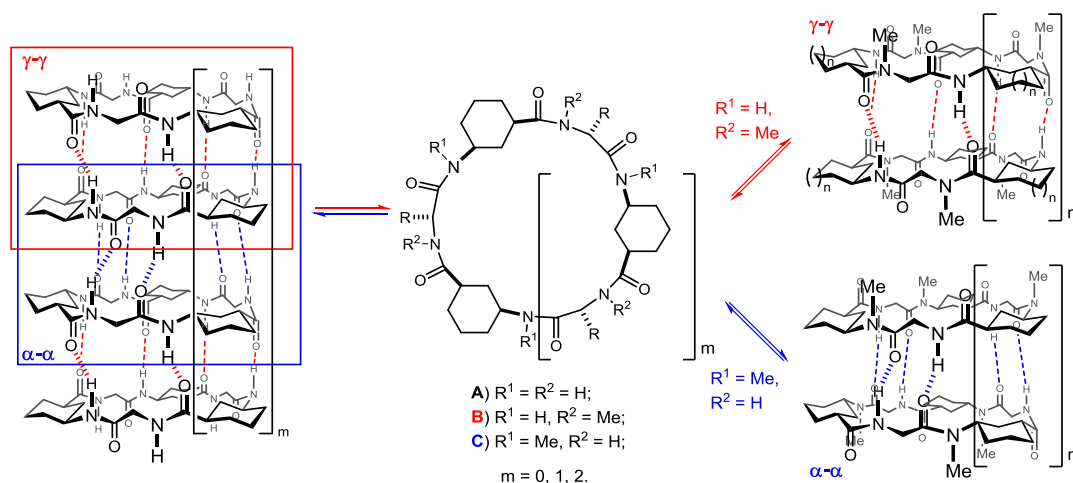


Figura 9. Formación de nanotubos (A; izquierda) y dímeros (B y C; derecha) a partir de α,γ -CPs. En rojo se puede observar la interacción a través de la cara γ (N-metilación de los α -Aas) y en azul la interacción a través de la cara α (N-metilación de los γ -Aas).

Una de las grandes ventajas de este tipo de procesos es el control que permiten sobre el diámetro. De esta forma se modificó el tamaño del anillo preparándose diseños más grandes como los ciclooctapéptidos formados por cuatro residuos homocirales de α -Aas y cuatro residuos de la quiralidad complementaria de γ -Aas. Con estos péptidos se observó un comportamiento similar, volviendo a ser mucho más fuerte la interacción entre las caras α que entre por las caras γ .³⁰ Cuando se estudiaban anillos más pequeños como los ciclotetrapéptidos, las constantes de asociación descendían de manera

³⁰ M. Amorín, L. Castedo, J.R. Granja, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6543–6551.

drástica; para la interacción γ - γ el número de enlaces de hidrógeno no eran lo suficientemente grandes como para que se observase el dímero, mientras que en el caso de la interacción α - α los valores de K_a no superaban valores en torno a 20 M^{-1} .³¹

La diferencia de estabilidad entre las dos clases de dímeros reflejada previamente se puede justificar en base a dos factores fundamentalmente. En primer lugar, la proximidad entre el grupo amina y el grupo carbonilo en los α -Aas provoca que el grupo N-metilo sufra impedimentos estéricos con el grupo carbonilo que dificulte la planaridad requerida para producir una interacción satisfactoria entre ambos ciclos. Además, la polarización del enlace N-H es menor en el caso del γ -Ach por estar el grupo carbonilo más alejado, lo que deriva en enlaces por puente de hidrógeno más débiles.

Hay que destacar también que la presencia de un grupo metileno (el carbono β de los γ -Aas) orientado hacia el interior de la cavidad interna de los ciclopeptidos le confiere propiedades hidrofóbicas, al contrario de lo que ocurría cuando solo se utilizaban α -Aas, lo que se confirmó al obtener cristales que presentaban moléculas de cloroformo en el interior del dímero.²⁸

En vista de los buenos resultados obtenidos con el γ -Ach, se sintetizó un nuevo γ -Aa no natural, el ácido *cis*-3-aminociclopentano carboxílico (γ -Acp). Con este nuevo amino ácido se esperaba que el mayor ángulo de los enlaces C_α -CO y C_γ -N facilitase la preparación de CPs de mayor tamaño que mantuviesen sus propiedades para autoensamblarse. Además, el hecho de tener un átomo de carbono menos en la parte externa del CP hace que la superficie expuesta sea algo menos hidrofóbica, facilitando su uso para aplicaciones que impliquen la utilización de estos compuestos en medio acuoso.

Adicionalmente, el número de CPs con propiedades para apilarse formando dímeros o nanotubos que incorporan γ -Aas es muy extenso y variado. El número de α - y γ -Aas puede variarse sin que aparentemente repercuta en sus propiedades para autoensamblarse. Eso sí, siempre que se mantenga la alternancia de quiralidad entre dos Aas contiguos. De esta forma se diseñaron los γ -CPs, que únicamente están formados por γ -Aas, diseños que alternan un número diferente de α - y γ -Aas como ciclooctapéptidos $3\alpha,\gamma$.³² Otra propiedad que incrementa la variedad estructural es la formación de heterodímeros de α,γ -ciclopeptidos de Ach y α,γ -ciclopeptidos de Acp.³³

En cuanto a la funcionalización de la cavidad interna, en el grupo de Juan Granja se han desarrollado varios diseños que incluyen en su estructura γ -Aas modificados en su posición β . Recientemente, se han preparado una gran variedad de γ -aminoácidos cíclicos protegidos que incluyen diferentes grupos funcionales unidos al carbono β , los cuales pueden utilizarse para formar nanotubos ciclopeptídicos. Los grupos funcionales en cuestión abarcan desde un metilo, un átomo de flúor o un grupo hidroxilo. Todos los Aas funcionalizados se obtenían con buenos rendimientos y con la conformación *cis*

³¹ M. Amorín, R.J. Brea, L. Castedo, J.R. Granja, *Org. Lett.* **2005**, 7, 4681–4684.

³² M. Amorín, L. Castedo, J.R. Granja, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 2100–2111.

³³ R.J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J.R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710–5713.

requerida para el autoensamblaje.³⁴ La mayor parte de estas síntesis se llevaban a cabo con mezclas racémicas, por lo que era necesario un último paso de resolución enantiomérica. En este sentido, es de destacar la síntesis del ácido 4-amino-3-hidroxitetrahidrofurano-2-carboxílico, cuya síntesis utiliza como sustancia de partida una especie quiral ya existente en la naturaleza (lo que se conoce por el término inglés *chiral pool*) como la *D*-xilosa. Este aminoácido presenta como principal característica que incorpora un grupo hidroxilo el cual, al adoptar la conformación plana el CP, queda proyectado hacia el interior de su cavidad.³⁵ Utilizando una técnica similar, se llevó a cabo la modificación del ácido 1-aminoglucurónico, con el que se pudo obtener un γ -Aa que exponía un grupo éter (oxígeno hemiaminámico) a la cavidad y que además presentaba tres grupos hidroxilo proyectados hacia la parte externa del ciclopéptido, lo que le confería propiedades hidrofílicas.³⁶

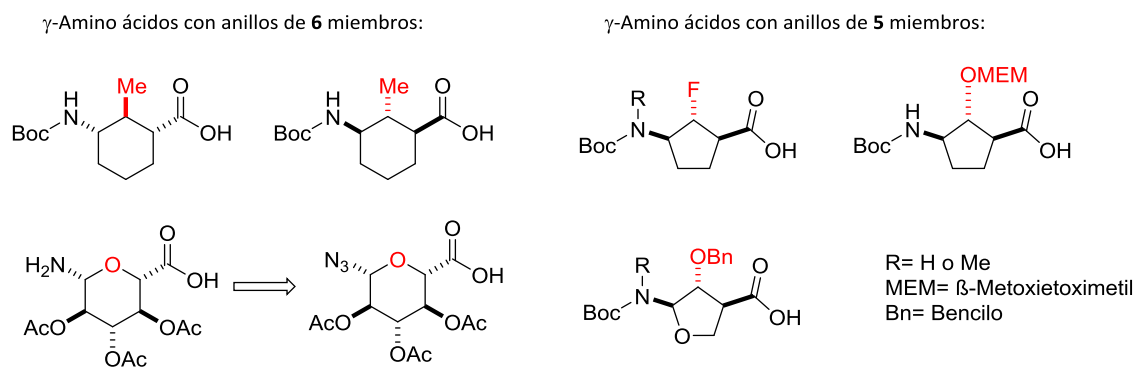


Figura 10. Diferentes γ -Aas funcionalizados en su posición β que han sido sintetizados en nuestro grupo de investigación. Nótese que alguno de ellos también ha sido obtenido como derivados N-metilado.

1.4 Aplicaciones de los nanotubos peptídicos: presente y futuro

Dada la gran variabilidad de diseños que se han desarrollado de CPs que tienen capacidad para autoensamblarse, el número de aplicaciones de estas moléculas es enorme. Como ya se ha comentado, existe un gran número de factores con los que se puede modular el comportamiento de los nanotubos: propiedades internas y externas, mediante la funcionalización de γ -Aa y la selección de las cadenas laterales de los α -Aa respectivamente o el control del diámetro de la cavidad interna del nanotubo mediante la selección del número y tipo de Aas empleados. Además, a esto hay que añadir la

³⁴ N. Rodríguez-Vázquez, S. Salzinger, L.F. Silva, M. Amorín, L. Castedo, J.R. Granja, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 3477–3493

³⁵ C. Reiriz, M. Amorín, R. García-Fandiño, L. Castedo, J.R. Granja, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 4358–4361.

³⁶ A. Guerra, R.J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J.R. Granja, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 8762–8766.

posibilidad de modificar químicamente las cadenas laterales de algunos α -Aa presentes en la estructura y realizar así ciclopéptido-conjugados.

Un campo particularmente prolífico es el de la química biológica, en el que los nanotubos ciclopeptídicos ofrecen soluciones ante retos complejos. Una de estas aplicaciones es como agentes antimicrobianos. A día de hoy, la aparición de un gran número de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos convencionales hace necesario el desarrollo de nuevos compuestos que puedan combatir a las bacterias más resistentes. En esta línea, los ciclopéptidos pueden utilizarse como agentes antimicrobianos gracias a dos modos de acción diferentes. El primero de ellos consiste en la formación del nanotubo por autoensamblaje sobre la superficie externa de la membrana bacteriana destruyéndola, mientras que la segunda se basa en la formación de agrupaciones de nanotubos peptídicos tipo barril β que son capaces de formar un canal transmembrana que interrumpe por completo el equilibrio quimiosmótico de la bacteria, causando de igual forma su muerte.³⁷ En ambos casos, es necesario utilizar un ciclopéptido anfipático que presente una parte hidrofílica y en el lado opuesto otra hidrofóbica. En este campo, también hay que destacar la utilización de nanotubos ciclopeptídicos glico-conjugados que aportan una mayor selectividad por ciertas bacterias frente a otro tipo de organismos.³⁸

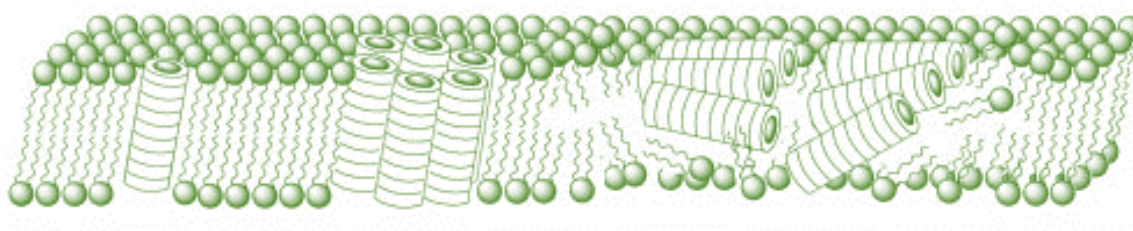


Figura 11. Representación de los modos de acción de los nanotubos ciclopeptídicos antimicrobianos. A la izquierda se representa un único nanotubo que actúa como un canal transportador, mientras que en el medio se muestra la formación de un gran poro mediante la interacción de varios nanotubos. A la derecha se muestra el modo de acción conocido como “*carpet-like*”, en el que los ciclopéptidos se disponen horizontalmente con respecto a la bicapa.

Otra área de la química biológica en la que los ciclopéptidos tienen una gran proyección es en el desarrollo de canales transmembranales sintéticos. Como ya se comentó al principio de esta introducción, dada la naturaleza de las membranas biológicas, estas son impermeables a una gran parte de solutos polares, como es el caso de iones inorgánicos. Sin embargo, muchas de las funciones que realizan las células dependen en gran parte del equilibrio y regulación de la concentración de solutos de este tipo. Por ejemplo los cationes de los metales alcalinos, que están involucrados en multitud de procesos biológicos. Dada la gran relevancia que tiene el transporte de estos analitos en los organismos vivos, y más particularmente los problemas derivados de su

³⁷ S. Fernández-López, H.S. Kim, E.C. Choi, M. Delgado, J.R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D.A. Weinberger, K.M. Wilcoxon, M.R. Ghadiri, *Nature* **2001**, 412, 452–455.

³⁸ L. Motiei, S. Rahimipour, D.A. Thayer, C.-H. Wong, M.R. Ghadiri, *Chem. Commun.* **2009**, 3693–3695.

mal funcionamiento en los seres humanos, conocidos como canalopatías,³⁹ es necesario desarrollar nuevos canales transmembranales para el transporte de analitos polares de forma eficiente y selectiva. Los primeros experimentos con nanotubos peptídicos se llevaron a cabo usando *D,L*- α -ciclopéptidos que contenían Aas hidrofóbicos como el triptófano o la leucina en su secuencia. Los octapéptidos eran capaces de transportar iones sodio y potasio con un flujo mayor incluso que otras moléculas transportadoras de origen natural,⁴⁰ como la gramicidina A⁴¹ o la anfotericina B.⁴² También se estudiaron CPs que contenían en su secuencia γ -Aas y una alta proporción de unidades de triptófano, los cuales también eran capaces de transportar iones alcalinos de manera selectiva frente a otros iones biológicamente relevantes como Ca^{2+} o Cl^- , siendo particularmente destacado el elevado flujo de Na^+ .⁴³ Con este trabajo también se demostró que el tamaño mínimo para el transporte de iones metálicos era el de los ciclooctapéptidos compuestos por cuatro α -Aas y cuatro γ -Aas, puesto que ciclos más pequeños como ciclohexapéptidos sólo eran capaces de transportar protones a través de la membrana.

Los CPs con predisposición para el autoensamblaje también se han utilizado en el campo de la detección de moléculas, lo que se conoce tradicionalmente como un sensor. En esta línea, en el grupo de Ghadiri consiguieron acoplar un nanotubo *D,L*- α -ciclopéptídico insertándolo en una monocapa autoensamblada (denominada normalmente por sus siglas inglesas SAM) de organosulfuros sobre oro, de tal manera que era capaz de reconocer ciertos complejos metálicos con ligandos cianuro según su tamaño (Figura 12).⁴⁴ Otro ejemplo fue la utilización de ciclopéptidos para modificar las propiedades de otras moléculas más grandes que actúan como sensores. En esta línea destaca la α -hemolisina,⁴⁵ que es una proteína que forma un canal transmembránico con capacidad para transportar diversos analitos, la cual admite la inserción de moléculas pequeñas en su interior para así regular el tamaño de su poro. A pesar de que los estudios pioneros en este campo se llevaron a cabo con ciclodextrinas,⁴⁶ posteriormente se demostró que los ciclopéptidos constituidos por α -Aas también podían llevar a cabo la modulación de sus propiedades transportadoras, detectando particularmente moléculas polianiónicas como el inositol trifosfato,⁴⁷ un segundo mensajero en la comunicación celular.

³⁹ F.M. Ashcroft, *Nature* **2006**, 440, 440-447.

⁴⁰ M.R. Ghadiri, J.R. Granja, L.K. Buehler, *Nature* **1994**, 369, 301-304.

⁴¹ R. Ketchum, W. Hu, T. Cross, *Science* **1993**, 261, 1457-1460.

⁴² A. Cass, A. Filkenstein, V. Krespi, *J. Gen. Physiol.* **1970**, 56, 100-124.

⁴³ R. García-Fandiño, M. Amorín, L. Castedo, J.R. Granja, *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3280-3285.

⁴⁴ K. Motesharej, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11306-11312.

⁴⁵ L. Song, M.R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J.E. Gouaux, *Science*, **1996**, 274, 1859-1866.

⁴⁶ L.-Q. Gu, M. Dalla-Serra, J. B. Vincent, G. Vigh, S. Cheley, O. Braha, H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 3959.

⁴⁷ J. Sánchez-Quesada, H. Bayley, M.R. Ghadiri, O. Braha, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11757.

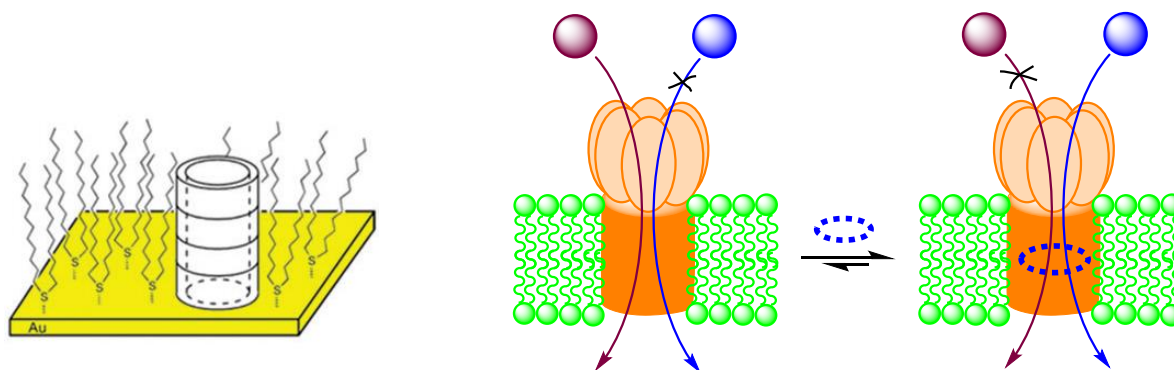


Figura 12. A la izquierda se muestra el ejemplo de un nanotubo insertado en un SAM que es capaz de detectar solo los complejos metálicos cuyo tamaño les permite atravesar el nanotubo mientras que a la derecha se puede observar como la introducción de un “filtro” ciclopeptídico modula el paso de diferentes analitos a través de la α -hemolisina.

En el campo de la electrónica, debido a la actual demanda de dispositivos de dimensiones reducidas, es especialmente relevante encontrar nuevos métodos de obtención de materiales moleculares con propiedades electrónicas excepcionales, dado que se están empezando a alcanzar los límites de los métodos tradicionales basados en el *top-down*.⁴⁸ En este ámbito, también se han utilizado CPs para el desarrollo de lo que podríamos denominar como dispositivos moleculares. Estas aproximaciones son particularmente relevantes dado que las características de los nanotubos ciclopeptídicos permiten el alineamiento preciso de diferentes motivos estructurales, como derivados de diimidonaftalenos,⁴⁹ fullerenos⁵⁰ o pirenos,⁵¹ que permiten la formación de complejos de transferencia energética. Estos complejos pueden ser interesantes en futuras aproximaciones para la construcción de nanocables que se extiendan en una única dirección del espacio.

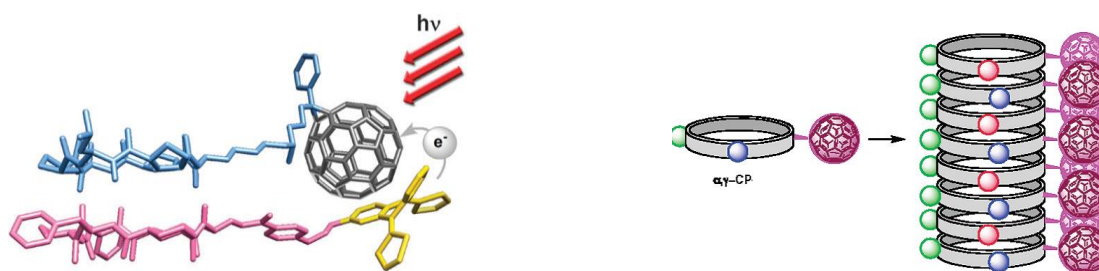


Figura 13. Izquierda: transferencia electrónica fotoinducida entre una unidad dadora benzotiafulvaleno y un fullereno facilitada por la formación de un dímero ciclopeptídico. Derecha: Alineamiento de unidades fullerénicas mediante el anclaje a CPs que se autoensamblan, los cuales podrían ser relevantes en el diseño de nanocables 1D.

⁴⁸ M.J. Kelly, *Nanotechnology* **2011**, 22, 245303.

⁴⁹ N. Ashkenasy, W.S. Horne, M.R. Ghadiri, *Small* **2006**, 2, 99.

⁵⁰ a) C. Reiriz, R.J. Brea, R. Arranz, J.L. Carrascosa, A. Garibotti, B. Manning, J.M. Valpuesta, R. Eritja, L. Castedo, J.R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 11335. b) G. Aragay, B. Ventura, A. Guerra, I. Pintre, C. Chiorboli, R. García Fandiño, L. Flamigni, J.R. Granja, P. Ballester, *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 3427-3438.

⁵¹ R.J. Brea, M.E. Vázquez, M. Mosquera, L. Castedo, J.R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1653.

Cada vez es mayor la presencia de diseños basados en ciclopéptidos en el campo de la ciencia de materiales o, mejor dicho, de los nanomateriales.⁵² En el año 1999, en el grupo de Ghadiri consiguieron desarrollar sistemas ciclopeptídicos diméricos que incluían una funcionalidad azobenceno en una de las cadenas laterales de los aminoácidos y que podía actuar como un material supramolecular fotomodulable, ya que en una de las conformaciones del azobenceno se controlaba la polimerización entre las subunidades ciclopeptídicas mientras que en la otra conformación la interacción estaba limitada a la especie dimérica.⁵³

Imitando los fenómenos de mineralización naturales, se desarrollaron también nanotubos que al cristalizar eran capaces de promover el crecimiento de nanoclústers metálicos en sus bordes.⁵⁴ Unos años más tarde, en un trabajo liderado por Biesalski, se utilizó un nanotubo ciclopeptídico modificado en sus cadenas laterales como una plantilla para la polimerización de acrilamida, lo que daba lugar a un nuevo material híbrido⁵⁵. Recientemente también se ha empleado una plataforma ciclopeptídica para crear un agregado polimérico con dos regiones con propiedades perfectamente diferenciadas y que podían utilizarse por sus propiedades antimicrobianas.⁵⁶ En el desarrollo de materiales híbridos, también destacan dos trabajos recientemente publicados en nuestro grupo de investigación. En el primero de ellos se combinaron α,γ -ciclohexapéptidos con dendrones derivados del ácido benzoico, los cuales eran capaces de formar estructuras mesógenas conteniendo cavidades porosas, cuyo tamaño se podía controlar simplemente modificando el tamaño del ciclopéptido empleado.⁵⁷ En el segundo de ellos se consiguió combinar nanotubos de α,γ -ciclopéptidos que incluían pirenos con nanotubos de carbono, los cuales constituyeron el primer ejemplo descrito en la bibliografía en el que se acoplaban dos nanomateriales monodimensionales.⁵⁸

⁵² G. M. Whitesides, *Small* **2005**, *1*, 172–179.

⁵³ M.S. Vollmer, T.D. Clark, C. Steinem, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1598.

⁵⁴ J.D. Hartgerink, T.D. Clark, M.R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1367.

⁵⁵ J. Couet, J. D. J. S. Samuel, A. Kopyshev, S. Santer, M. Biesalski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3297.

⁵⁶ M. Danial, C.M.-N. Tran, P.G. Young, S. Perrier, K.A. Jolliffe, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2780.

⁵⁷ M. Amorín, A. Pérez, J. Barberá, H.L. Ozores, J. L. Serrano, J.R. Granja, T. Sierra, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 688–690.

⁵⁸ J. Montenegro, C. Vázquez-Vázquez, A. Kanilin, K.E. Geckeler, J.R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2484–2491.

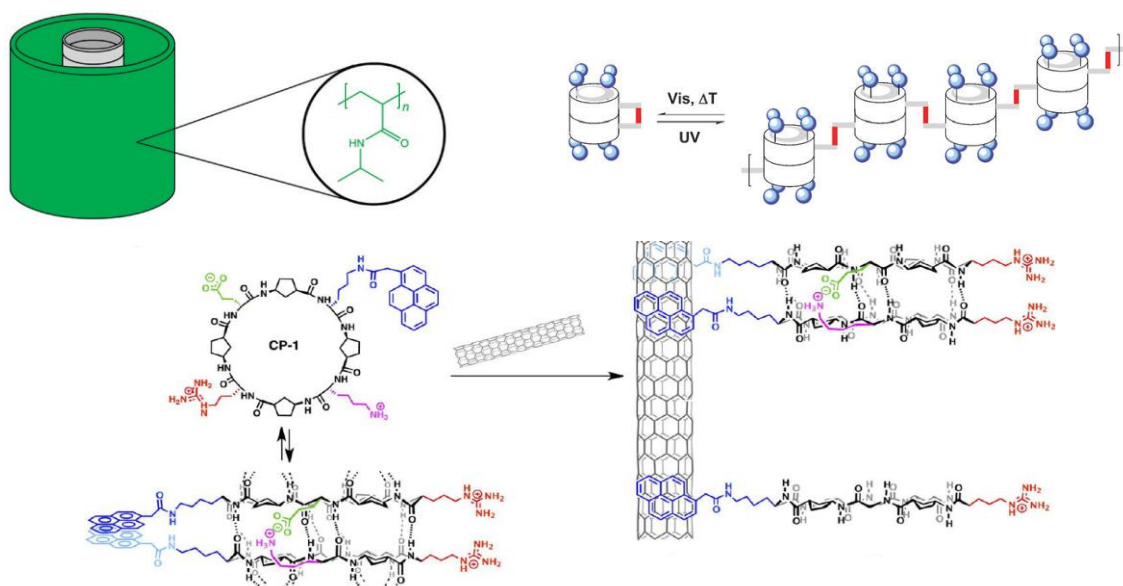
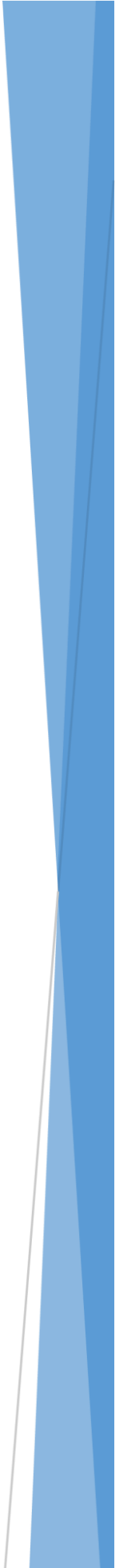


Figura 14. Aplicaciones de los ciclopeptidos en el campo de la ciencia de materiales. Arriba a la izquierda se muestra la polimerización de acrilamida anclada a un nanotubo peptídico, mientras que a la derecha se puede observar el comportamiento fotomodulable de derivados diméricos. Abajo se representa el híbrido de nanotubos de carbono y nanotubos peptídicos recientemente desarrollado en nuestro grupo de investigación.

Para concluir, es obvio que los nanotubos ciclopeptídicos son plataformas útiles para llevar a cabo una gran diversidad de funciones en campos tan diversos como la química biológica o la ciencia de materiales. Sin embargo, la realidad es que las posibilidades que ofrecen estas supramoléculas aún no han sido exploradas en toda su extensión, por lo que en los próximos años se continuará innovando para dar lugar a nuevos diseños con aplicaciones que hasta hace no mucho tiempo podrían considerarse como salidas de la ciencia-ficción.

Capítulo 2: Objetivos



2. Objetivos

Teniendo en cuenta todos los antecedentes descritos en el campo de los ciclopeptidos, el objetivo principal de este Proyecto de Fin de Máster es el diseño y síntesis de una nueva clase de nanotubos peptídicos, los cuales alternan en su estructura dos tipos de ciclopeptidos con propiedades bien diferenciadas. Para ello, pretendemos desarrollar estrategias covalentes que permitan unir dos ciclopeptidos de propiedades diferenciadas pero manteniendo tanto la conformación plana como sus propiedades para autoensamblarse (Figura 15).

A pesar de que ya se había utilizado la química covalente para la formación selectiva de dímeros ciclopeptídicos,⁵⁹ esta plataforma covalente únicamente actuaba como apoyo al proceso de formación de enlaces de hidrógeno entre ambos ciclopeptidos y además la unión entre ambos ciclos se realizaba a través de la funcionalización de las cadenas laterales de los aminoácidos empleados y no en la vertical del plano de los ciclos. Adicionalmente el proceso estaba restringido a la formación de homodímeros. Sin embargo, en este trabajo la unión covalente entre ciclopeptidos se concibe como la única forma de unión por una de sus caras y se extiende verticalmente.

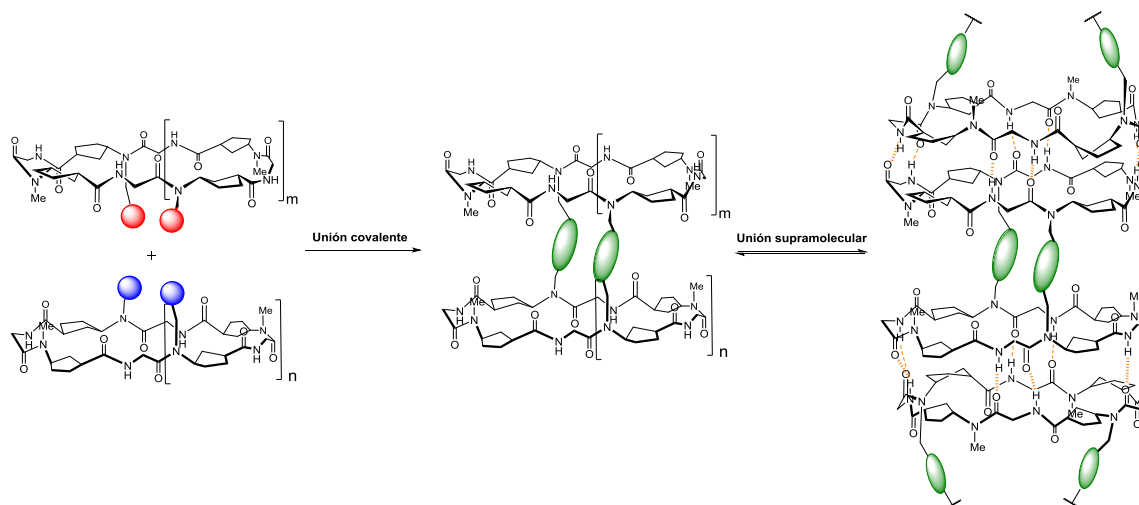


Figura 15. Esquema para la formación de los nanotubos ciclopeptídicos híbridos, con una primera etapa de formación del esqueleto covalente y una segunda etapa de formación de los agregados supramoleculares.

Este nuevo sistema que proponemos puede considerarse como el primer ejemplo descrito en la bibliografía, hasta donde llega nuestro conocimiento, de lo que podríamos denominar como un “homodímero supramolecular de heterodímeros covalentes”. En otras palabras, pretendemos unir covalentemente dos ciclopeptidos de tamaños y/o

⁵⁹ **Unión de α -CPs:** a) T.D. Clark, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12364-12365. b) T.D. Clark, K. Kobayashi, M.R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 782-792. **Unión de α,γ -CPs:** Tesis doctoral de Roberto J. Brea Fernández, Santiago de Compostela, Febrero 2013.

propiedades diferentes, dadas las posibles implicaciones que ello puede tener a la hora de sus aplicaciones (ver a continuación) y a su vez permitir que ese aducto covalente de dos péptidos pueda autoensamblarse con otra unidad idéntica para formar un complejo supramolecular (Figura 15).

Para la primera aproximación a esta nueva familia de nanotubos ciclopeptídicos nos hemos decantado por el uso de una reacción de tipo *Click*⁶⁰ entre un α,γ -ciclotetrapéptido que contenga en su eje vertical un grupo funcional azida ($-N_3$) y otra unidad ciclopeptídica más grande, concretamente un α,γ -ciclooctapéptido que contenga un alquino terminal ($-C\equiv CH$), para así poder realizar una cicloadición 1-3 dipolar mediada por cobre (I), conocida tradicionalmente como reacción de Huisgen azida-alquino.⁶¹

Para introducir ambos grupos funcionales susceptibles de reaccionar entre sí, se pretende incorporarse una cadena alquílica que contenga el grupo deseado en el átomo de nitrógeno (N-funcionalización) del γ -Aa cíclico Acp, de tal manera que la cara γ de los ciclopéptidos quede bloqueada con estos grupos mientras que la cara α opuesta permanezca libre para formar enlaces por puente de hidrógeno dando lugar a dímeros supramoleculares que, como ya se ha comentado anteriormente, son mucho más fuertes que los derivados de interacciones γ - γ ²⁹ (Figura 16).

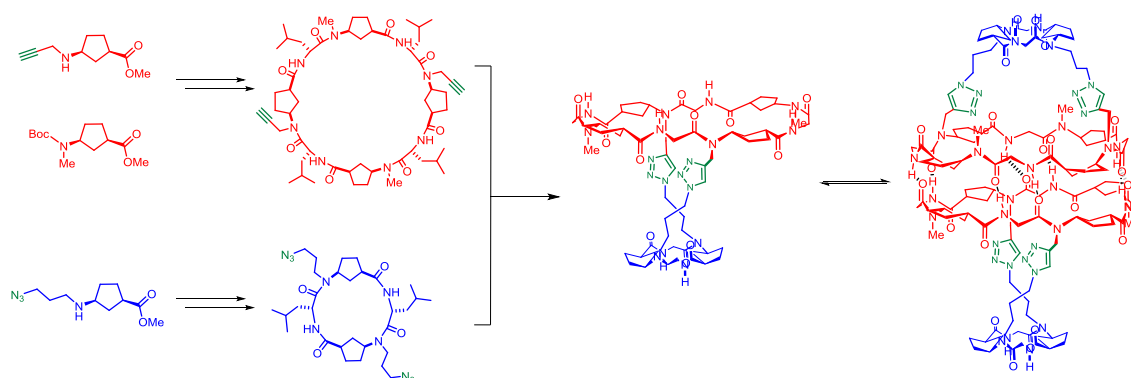


Figura 16. Esquema del plan de trabajo, comenzando por la síntesis de los γ -Aa N-funcionalizados, seguida de la obtención de ambos CPs, su posterior unión covalente y por último su dimerización supramolecular a través de la cara α del ciclooctapéptido.

Aunque se podría considerar este sistema como una cápsula molecular dada su forma derivada de la interacción a través del ciclopéptido más grande, a largo plazo, nuestro interés es confirmar la posibilidad de combinar ambos tipos de uniones (covalente y enlace de hidrógeno) para construir dímeros en los que la distribución sea la opuesta, es decir, que la dimerización supramolecular se produzca a través del ciclopéptido más pequeño en la parte central mientras que en los extremos queden expuestos ciclopéptidos de mayor tamaño que tengan bloqueada una de sus caras para

⁶⁰ H.C. Kolb, M.-G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2011.

⁶¹ R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, 785, 604-637.

seguir creciendo. Este tipo de diseños podrían ser considerados como embudos moleculares, que podrían tener gran potencial en el campo del transporte de analitos a través de bicapas lipídicas (Figura 17). Además, el hecho de tener una zona interior más estrecha, hace pensar que esta región pueda actuar en cierto modo como un filtro de selectividad igual que sucede en muchas proteínas transportadoras naturales, mientras que el ciclopéptido de mayor tamaño funcione como una gran boca que facilite el flujo a través de la bicapa al quedar anclado en los extremos de la bicapa. Dado el propio diseño del dímero covalente, es relativamente sencillo controlar la longitud del sistema y ajustarlo a la anchura de unos 30 Å de las bicapas lipídicas, para que su inserción en ellas sea favorable si se escogen α -Aas con cadenas laterales apolares, como la leucina en este caso.

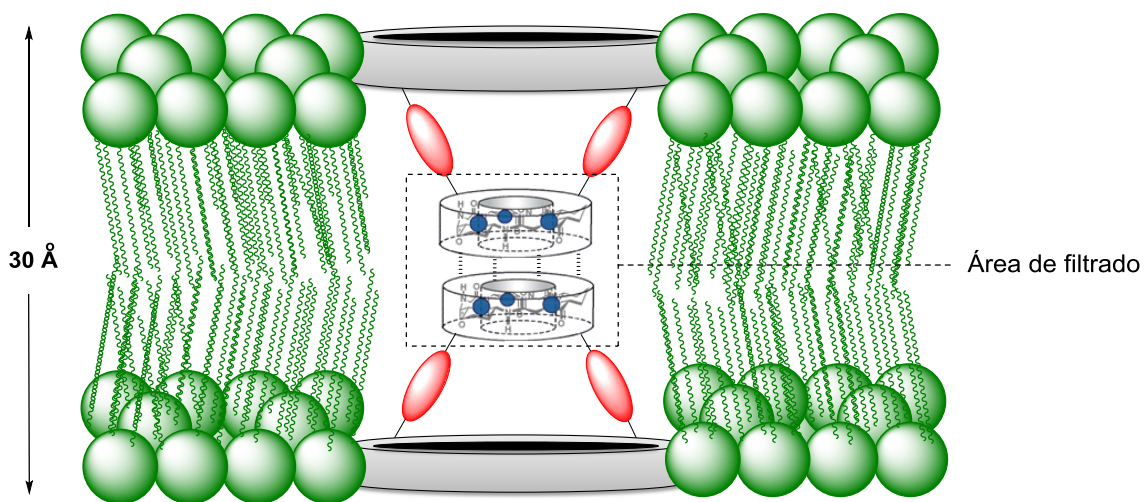
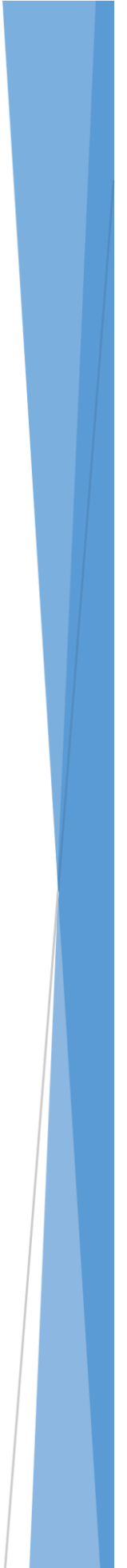


Figura 17. Representación esquemática del embudo transportador basado en ciclopéptidos unidos covalentemente, donde los discos grises de los extremos actuarían facilitando del tránsito de analitos a través de las membranas mientras que las subunidades centrales más estrechas tendrían un papel similar al del filtro de selectividad que presentan las proteínas naturales.

Capítulo 3:

Resultados y Discusión

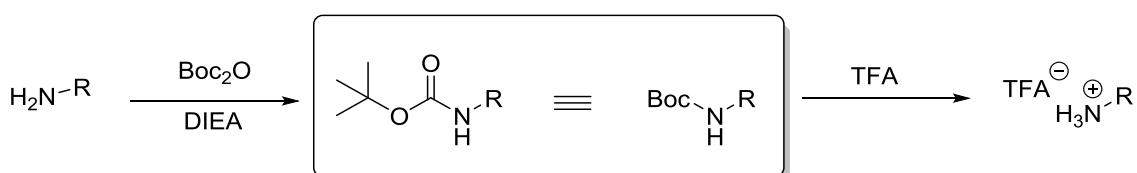


3. Resultados y Discusión

3.1 Grupos protectores

En la química de amino ácidos y péptidos, es de vital importancia conseguir que la reactividad del grupo amina de un extremo y del grupo ácido del otro sean específicas en cada paso de la secuencia sintética, entendiendo por especificidad la reactividad de uno de estos grupos funcionales mientras que la reactividad del otro sea nula. Para ello, es preciso diseñar una ruta sintética que incluya grupos protectores ortogonales, es decir, que puedan ser añadidos o eliminados selectivamente sin afectar a los demás grupos protectores presentes o a otras partes sensibles del esqueleto peptídico. Además, en este trabajo en concreto, es preciso considerar que las condiciones para llevar a cabo la protección y desprotección de estos grupos deben respetar la estereoquímica presente en el esqueleto peptídico, manteniendo en el mínimo posible la pérdida de quiralidad en alguno de los centros estereogénicos presentes, lo que provocaría la aparición de mezclas diastereoméricas de productos que harían mucho más difíciles los procesos de separación y purificación y reducirían el rendimiento global de la ruta sintética. Teniendo todos estos factores en cuenta, nos hemos decantado por utilizar los siguientes grupos protectores.

3.1.1 Extremo amino-terminal: Grupo *Boc* (*tert*-butiloxicarbonilo)



Esquema 1. Procedimiento para la protección y desprotección de una amina con el grupo *Boc*.

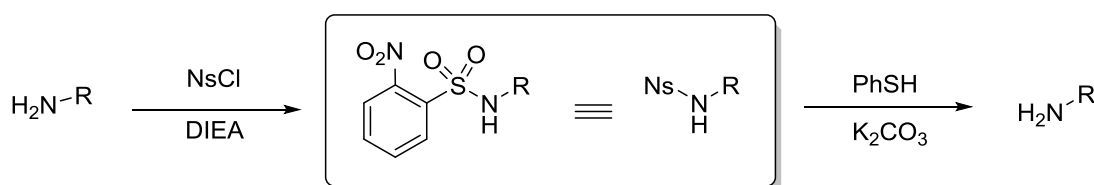
Sin duda alguna se trata de uno de los más utilizados en la química de péptidos. Consiste en la formación de un carbamato inerte a procesos como la hidrogenación, además de soportar la presencia de bases y nucleófilos. Este carbamato hace que los protones de la posición α a la amina sean menos ácidos, lo que es relevante a la hora de limitar la epimerización en ese carbono al trabajar en medio básico, condición *sine qua non* en este trabajo.

Para llevar a cabo la protección, se acostumbra a utilizar el anhídrido de *tert*-butiloxicarbonilo (Boc_2O), el cloruro de *tert*-butiloxicarbonilo (BocCl) o el 2-(*tert*-butiloxicarboniloxiimino)-2-fenilacetnitrilo (Boc-ON), en medio básico (DIEA o NaHCO_3) y utilizando generalmente disolventes de base acuosa ($\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ o $\text{H}_2\text{O}/\text{Dioxano}$). En

general, esta reacción procede de manera muy limpia, siendo los rendimientos superiores al 90%.

En cuanto a la etapa de desprotección, a escala de laboratorio se lleva a cabo mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA), bien sea solo o diluido en CH_2Cl_2 . La reacción con TFA es muy rápida, normalmente se completa en menos de diez minutos si se trata de la desprotección de un único grupo y prolongándose ligeramente si hay más grupos Boc presentes en el sustrato. En algunos casos se necesita la adición de reactivos (*scavengers*) que atrapen los carbocationes *tert*-butilo que se generan en el proceso. A pesar de todas estas ventajas, el TFA también presenta algunas desventajas, como su alta volatilidad y poder corrosivo o su relativamente elevado precio, lo que hace que en procesos de industria pesada se utilicen otras alternativas para la desprotección de este grupo, como por ejemplo HCl.⁶² Dada la escala empleada en este trabajo, el tratamiento con TFA diluido en CH_2Cl_2 (proporción de 1:1) ha sido la metodología de elección para llevar a cabo la desprotección de aminas protegidas con Boc.

3.1.2 Extremo amino-terminal: Grupo *Nosilo* (2-nitrobenzenosulfonilo)



Esquema 2. Procedimiento para la protección y desprotección de una amina primaria con el grupo nosilo.

Una de las etapas clave de este proyecto será la derivatización de los γ -Aas (Acp) mediante su N-funcionalización para luego poder proceder a unir los CP de los que forman parte. Para llevar a cabo dicha funcionalización, es preciso sustituir un protón unido al nitrógeno y posteriormente añadir una cadena alquímica que contenga un buen grupo saliente mediante una reacción de sustitución nucleofílica. Dada la tendencia de las aminas a dar productos de polialquilación, es altamente preferible realizar esta sustitución sobre el sustrato protegido. Para el propósito de este trabajo, el grupo nosilo es particularmente interesante, ya que además de dirigir la monoalquilación provoca que abstracción del protón amínico pueda realizarse con bases débiles de forma eficiente. Esto es debido al efecto del grupo nitro en la posición *orto* en el anillo aromático que retira carga y hace que el protón de la amina sea notablemente más ácido. Así, al usar condiciones más suaves, se evita en gran medida la abstracción de otros protones relativamente ácidos en el γ -Acp, particularmente el protón unido al carbono α , lo que causaría su epimerización. Este grupo presenta la ventaja de que su

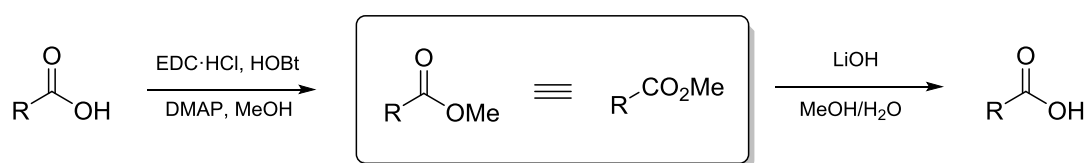
⁶² V.V. Andrushchenko, H.J. Vogel, E.J. Prenner, *J. Peptide Sci.* **2007**, *13*, 37–43

desprotección se puede realizar de forma quimioselectiva mediante la utilización de tioles.

Para el proceso de protección se utiliza el cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo (NsCl) en presencia de una base (generalmente DIEA) y utilizando un disolvente seco, en este caso CH_2Cl_2 , para evitar la posible competencia de los iones hidroxilo en la sustitución nucleófila del cloruro.

En cuanto a la desprotección, se utiliza tiofenol (PhSH) acompañado de una base débil (K_2CO_3) en DMF, con lo que se forma un tioéter a través de un intermedio tipo Meisenheimer⁶³ y se recupera la amina libre.⁶⁴

3.1.3 Protección del extremo C-terminal: grupo éster metílico (CO_2Me)



Esquema 3. Secuencia sintética para la formación/hidrólisis del éster metílico.

Por su sencillez y simplicidad sintética nos hemos decantado por este grupo protector en el extremo ácido. Hay que destacar que es un grupo muy tolerante al medio ácido, soportando las condiciones de desprotección del Boc con TFA descritas previamente.

Para su formación, se recurre a la clásica estrategia de la doble activación de ácidos carboxílicos. Para ello, en primer lugar se utiliza una carbodiimida (normalmente EDC o DCC) seguida de hidroxibenzotriazol (HOBT) para la formación de un éster activo en presencia de una base voluminosa (4-dimetilaminopiridina, DMAP). Este éster activo es muy reactivo frente a nucleófilos, por lo que si se usa metanol como disolvente se puede obtener el ácido protegido en muy buenos rendimientos.

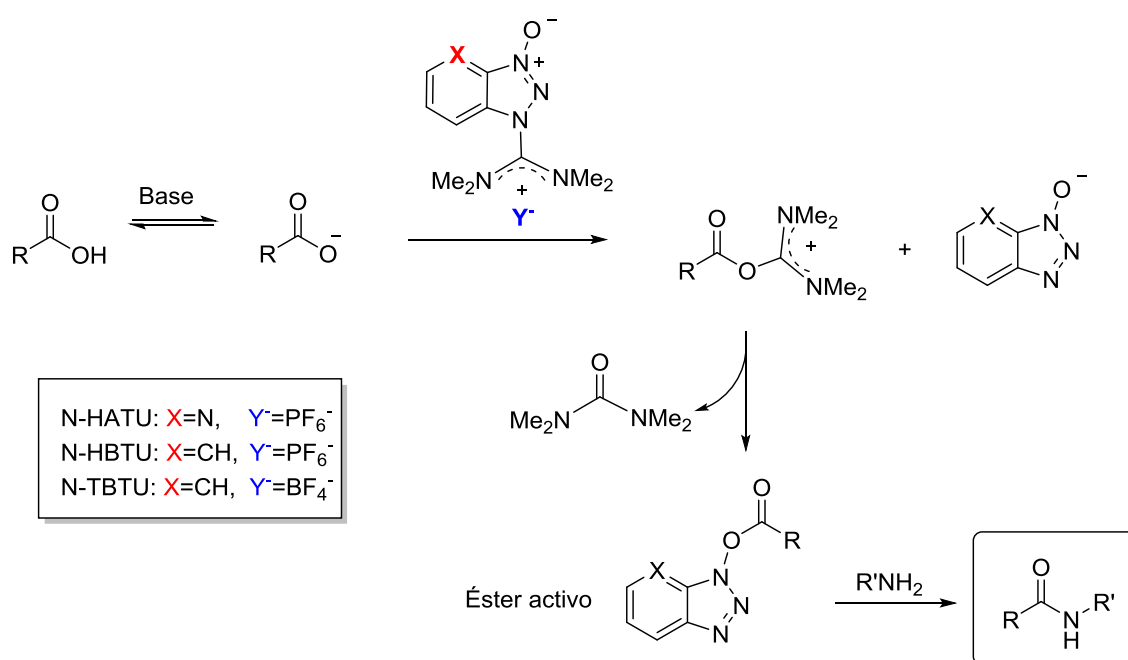
En cuanto a su desprotección, muchos hidróxidos de metales alcalinos (por ejemplo LiOH , NaOH o KOH) pueden ser empleados para la hidrólisis de este tipo de ésteres. Esta reacción se puede llevar a cabo en una variedad de disolventes, predominando el uso de mezclas $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ o $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$. Los rendimientos en esta etapa suelen ser prácticamente cuantitativos.

⁶³ IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997)

⁶⁴ T. Kan, T. Fukuyama, *Chem. Commun.* **2004**, 353-359.

3.2 Formación del enlace peptídico: agentes de acoplamiento

La reacción más recurrente a la hora de sintetizar ciclopéptidos son los acoplamientos peptídicos que unen dos aminoácidos o cadenas peptídicas cortas. Para formar los enlaces amida con buenos rendimientos y en una escala de tiempo razonable se precisa nuevamente de la activación del grupo carboxilo. Para ello se recurre a formación *in situ* de ésteres activos mediante el uso de agentes de acoplamiento tipo sales de aminio (*N*-HATU, *N*-HBTU, *N*-TBTU) (Esquema 4) o sales de fosfonio (PyAOP).⁶⁵



Esquema 4. Formación de enlaces peptídicos mediante el uso de sales de aminio.

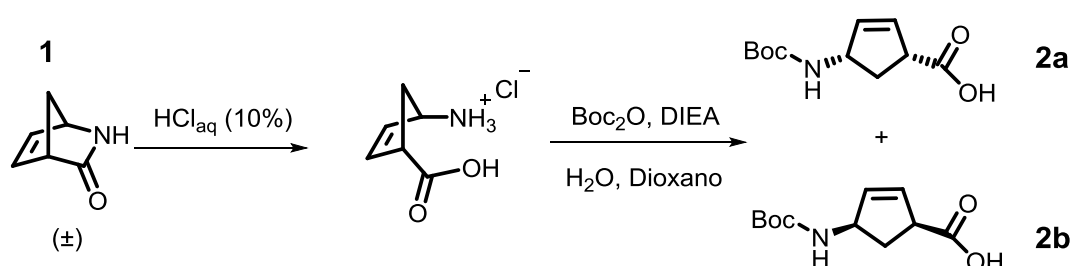
Como se puede observar en el Esquema 4, la abstracción del protón del ácido carboxílico promueve el primer ataque nucleófilo sobre el grupo aminio del reactivo de acoplamiento, lo que genera un primer derivado tipo éster de uronio que a su vez sufre un nuevo ataque por parte del otro fragmento del reactivo de acoplamiento liberado en la etapa anterior (el cual se asemeja al HOBt, cuyo uso ya ha sido discutido previamente). En esta nueva etapa, tras la pérdida de una unidad de tetrametilurea se forma el éster que será activo frente a la amina del aminoácido o péptido que se pretenda acoplar. Hay que tener en cuenta que una vez formado dicho éster activo, el hidrógeno de la posición α aumenta de acidez, por lo que se suelen utilizar bases voluminosas para procurar minimizar el proceso no deseado de epimerización.

⁶⁵ A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.

3.3 Síntesis del aminoácido Boc-L- γ -Ace-OH [ácido (1*R*,4*S*)-*cis*-4-amino-N-*tert*-butiloxicarbonilciclopenteno carboxílico]

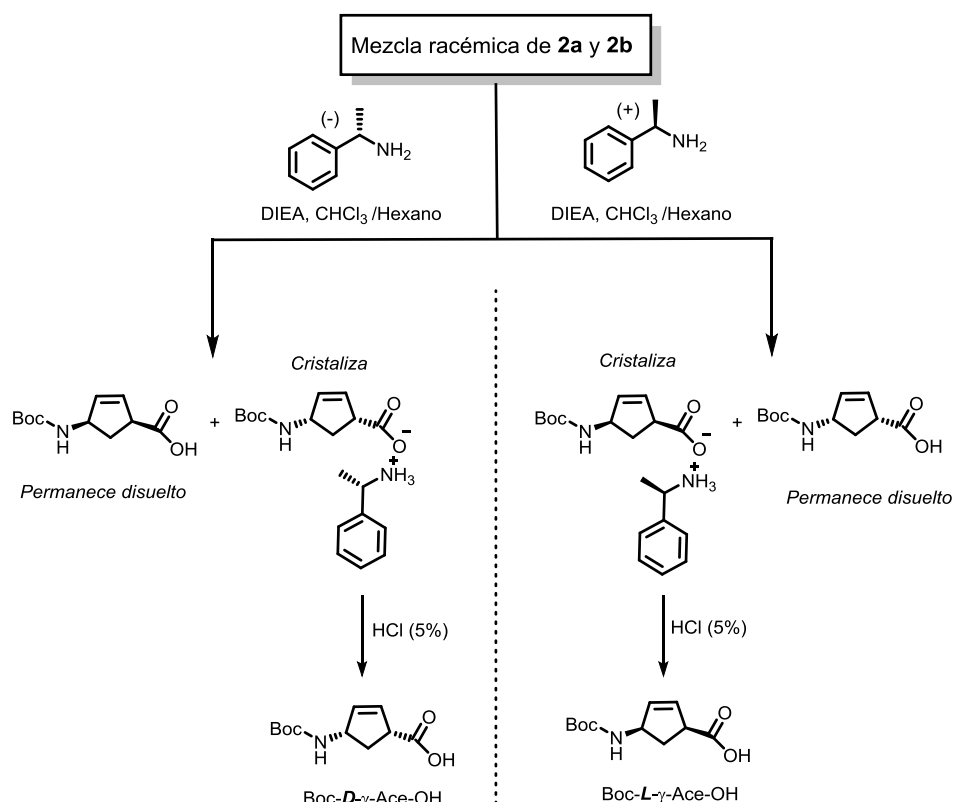
El primer esfuerzo sintético se dedicó a la síntesis en escala multigramo del enantiómero levógiro del γ -Aa cíclico Ace, que luego se redujo mediante hidrogenólisis para dar Acp, el cual junto con la D-Leucina constituyen el esqueleto peptídico fundamental de ambos ciclopéptidos objetivo.

Para ello, sobre el precursor sintético 2-azabicyclo[2.2.1]-hept-5-en-3-ona (conocido como lactama de Vince) (**1**) se llevó a cabo una hidrólisis ácida para romper el enlace lactama. La especie protonada resultante se protegió con Boc₂O en medio básico para dar lugar a la mezcla racémica protegida de los γ -Aa **2a** y **2b** (Esquema 5).



Esquema 5. Apertura y protección de la lactama de Vince racémica.

El siguiente paso consistió en la resolución de la mezcla racémica de **2a** y **2b** mediante cristalización clásica. Este método consiste en la formación de una pareja de diastereoisómeros a partir de un par de enantiómeros mediante el tratamiento con un reactivo enantiopuro. A diferencia de los enantiómeros, los diastereoisómeros son moléculas con propiedades químicas diferentes, lo que hace que su separación sea factible si se utiliza una técnica apropiada. En este caso particular, la resolución se llevó a cabo utilizando un único enantiómero de la amina quiral 1-feniletanamina, de tal manera que una de las sales formadas cristaliza en el disolvente de elección (CHCl₃/Hexano) mientras que la otra se mantiene soluble en disolución, permaneciendo en disolución (Esquema 6).³³ El uso de esta amina quiral viene determinado por el bajo coste de ambos enantiómeros, factor que debe ser tenido en cuenta al trabajar en este tipo de procesos en los que ambos enantiómeros son de interés.



Esquema 6. Proceso de resolución del Boc-γ-Ace-OH.

Concretamente, la primera cristalización se realiza usando $\text{CHCl}_3/\text{Hexano}$ (4:1) como disolvente y 0,6 equivalente del enantiómero (+) de la amina quiral [(R)-1-feniletalamina]. Nótese que al utilizar el enantiómero (+) de la amina se cristaliza el enantiómero L (1S,4R) del amino ácido y viceversa. A pesar de que los primeros núcleos de cristalización aparecieron al cabo de 24 horas, el proceso de cristalización se prolongó durante una semana. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se filtró y se suspendió el sólido obtenido en CH_2Cl_2 para luego lavarlo con HCl diluido, de forma que el ácido carboxílico se protonase y de este modo se liberarse de la sal. De esta manera, esta fracción de CH_2Cl_2 queda enriquecida en el enantiómero de interés, mientras que las aguas madres lo hacen del enantiómero contrario. En este punto, se midió la rotación óptica de la fracción enriquecida para comprobar el exceso enantiomérico obtenido tras la primera cristalización. El valor obtenido de $[\alpha]_{\text{D}}^{298} = -15^\circ$ resultó estar todavía muy alejado de los valores descritos en la bibliografía ($[\alpha]_{\text{D}}^{298} \approx -50^\circ$),³² por lo que quedó patente que era preciso realizar este proceso más veces. Para la segunda cristalización, se aumentó la cantidad de amina quiral hasta 1,0 equivalentes y se redujo la proporción de hexano utilizado en la mezcla de disolventes, ya que una cristalización demasiado rápida podría ser perjudicial en la resolución, haciendo que el enantiómero que no nos interesaba quedase capturado junto al de interés. Tras esta ($[\alpha]_{\text{D}}^{298} \approx -36^\circ$), una tercera cristalización fue necesaria para alcanzar un valor cercano al previamente descrito, concretamente $[\alpha]_{\text{D}}^{298} = -49,1^\circ$.

Dada la relativa variabilidad que tiene la medida de la rotación óptica, decidimos utilizar un método más robusto para la determinación precisa del exceso enantiomérico de nuestra muestra, dada la gran relevancia que tiene comenzar la síntesis con el

máximo de enantiopureza; por poner un ejemplo, si se quiere construir un ciclooctapéptido que contenga cuatro unidades de Acp en su secuencia y se ha partido de un exceso enantiomérico del 97%, a la hora de adquirir la conformación plana, habrá alrededor de un 12% de la población de ciclopeptido que no podrá hacerlo por incluir en su secuencia alguna unidad de Acp con la quiralidad errónea. En este caso, nos decantamos por la utilización de HPLC con una fase estacionaria quiral para determinar el exceso enantiomérico en las muestras que presentaban valores de rotación óptica cercanos al valor objetivo. Como se puede observar en la Figura 18, se comparó el cromatograma de una muestra patrón previamente preparada que incluía un ligero exceso del enantiómero *L* del Ace ($t_r=15,7$ min) frente al enantiómero *D* ($t_r=13,0$ min) (parte superior) con la muestra que se había obtenido tras la tercera cristalización (medio). En este punto, simplemente comparando la integral relativa del pico correspondiente a cada enantiómero se pudo determinar que el exceso enantiomérico de la muestra era mayor del 99%. Paralelamente, con las aguas madres obtenidas tras las cristalizaciones se actuó de manera similar, pero en este caso se pusieron a cristalizar con el enantiómero (-) de la amina, de nuevo repitiendo el proceso hasta 3 veces, lo que permitió obtener el enantiómero *D* (1*R*,4*S*) del Ace con un exceso enantiomérico cercano al 100% (parte inferior).

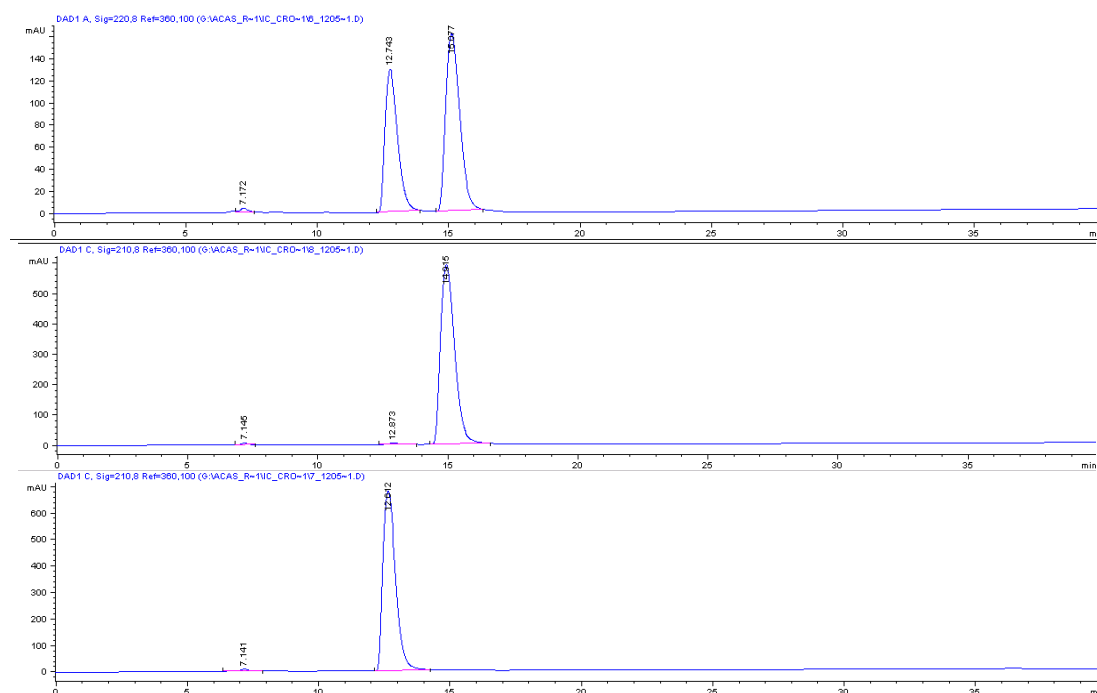


Figura 18. Diferentes cromatogramas utilizados para conocer el exceso enantiomérico tras las cristalizaciones del Boc-Ace-OH. En la parte superior se puede observar la muestra de referencia, mientras que al descender se observa una muestra enantiopura del enantiómero *L* y por último otra del *D* en la parte inferior.

3.4 N-funcionalización y protección del L- γ -Acp

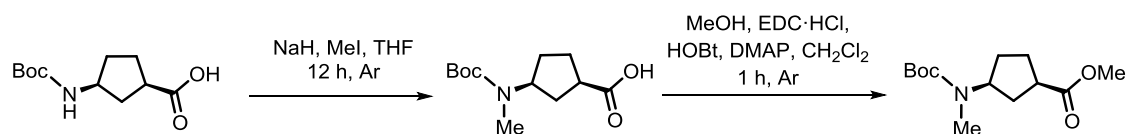
Dada la necesidad de obtener ciclopéptidos que contaran con en el esqueleto peptídico que permitan la unión covalente de dos unidades, el siguiente paso consistió en la derivatización del γ -Aa que iba a ser utilizado, en este caso el L- γ -Acp, que deriva simplemente de la hidrogenólisis del Boc-L- γ -Ace-OH, cuya síntesis se ha detallado en el punto anterior. Como ya se ha comentado en la introducción, es conocido que tras adquirir la conformación plana, los α,γ -ciclopéptidos orientan los átomos de hidrógeno de las amidas hacia la vertical del plano del ciclo, por lo que si estos átomos de hidrógeno de una de las caras son sustituidos por una cadena alquílica que contenga un grupo funcional reactivo la unión podría realizarse sin afectar a la planaridad del ciclo ni a la posibilidad de formación de enlace de hidrógeno por la cara que mantiene los grupos N-H. Conociendo que los dímeros de α,γ -CPs interaccionan más fuertemente mediante enlaces por puente de hidrógeno a través de la cara α se decidió N-funcionalizar la amina de los γ -Aas.

En el caso del α,γ -ciclotetrapéptido, que contiene únicamente dos unidades de Acp, se decidió unir el grupo funcional azida. Concretamente, se llevó a cabo el anclaje de cadenas tipo propil-azida ($^3\text{CN}_3$). La elección de un espaciador de tres carbonos viene determinada por la necesidad de añadir algo de flexibilidad para la unión con los grupos del ciclopéptido opuesto, que están más separados entre sí al estar unidos a un ciclo de mayor diámetro interno. No obstante, es deseable que la longitud total del dímero no exceda los 35 Å y que la forma de cápsula no se vea demasiado perturbada por la libertad conformacional de cadenas más grandes, teniendo en cuenta los futuros intereses en que actúe insertándose en membranas lipídicas. En cualquier caso, un espaciador de tres carbonos cumple con ambos requisitos, aportando algo de flexibilidad sin suponer una libertad de movimiento excesiva.

Para el α,γ -ciclooctapéptido, conteniendo cuatro unidades de Acp, se siguieron dos estrategias de N-funcionalización diferentes. Dado que sólo existirán dos grupos de anclaje en el ciclopéptido más pequeño, solamente dos grupos funcionales reactivos serán añadidos en este ciclo. La cadena conteniendo el alquino elegida en este caso es más corta, concretamente un grupo propargilo ($-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$). Las dos posiciones restantes únicamente se bloquearán mediante N-metilación, simplemente para evitar la formación de los enlaces de hidrógeno a los que podrían dar lugar.

El hecho de elegir uno u otro grupo de anclaje en cada uno de los ciclopéptidos no es especialmente relevante, ya que podrían ser intercambiados sin ningún problema. En nuestro caso, nos decantamos por añadir el grupo con la azida en el ciclopéptido más pequeño (y por lo tanto sintéticamente más sencillo), ya que su precursor no es comercial y por lo tanto su obtención es algo más costosa.

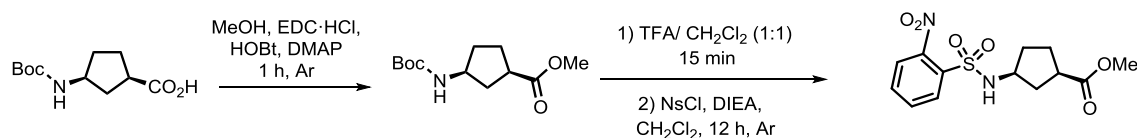
3.4.1 N-Metilación



Esquema 7. Proceso de obtención del L-Acp N-metilado y protegido con un grupo Boc y en forma de éster metílico.

La N-metilación se llevó a cabo sobre el Boc-aminoácido obtenido tras reducir el doble enlace, en forma de ácido libre. Para ello se trató con un exceso de una base fuerte como el hidruro sódico (NaH), que en primer lugar arranca el protón carboxílico para luego abstraer el protón sobre el nitrógeno. La formación inicial del anión carboxilato previene la formación del enolato entre el carbono del carbonilo y el carbono α , lo que causaría la pérdida de quiralidad en ese centro y la posterior epimerización. La alquilación ocurre preferentemente sobre el nitrógeno, ya que es el anión más reactivo. A pesar de que *a priori* el impedimento estérico provocado por el grupo Boc puede parecer un problema a la hora de realizar el ataque nucleófilo, en el caso de electrófilos pequeños como el grupo metilo no se trata de un factor a tener en cuenta, ya que los rendimientos para esta reacción son muy buenos. A continuación se protegió el extremo C-terminal siguiendo la doble activación de ácidos carboxílicos previamente descrita, con lo que el amino ácido N-metil derivado ya estuvo listo para comenzar con los acoplamiento peptídicos. Es importante respetar el orden de estas dos reacciones, ya que si se invierte y se trata con una base fuerte el amino ácido en forma de éster se produciría la epimerización en el carbono α .

3.4.2 N-funcionalización con grupos voluminosos: propargilo y propil-azida

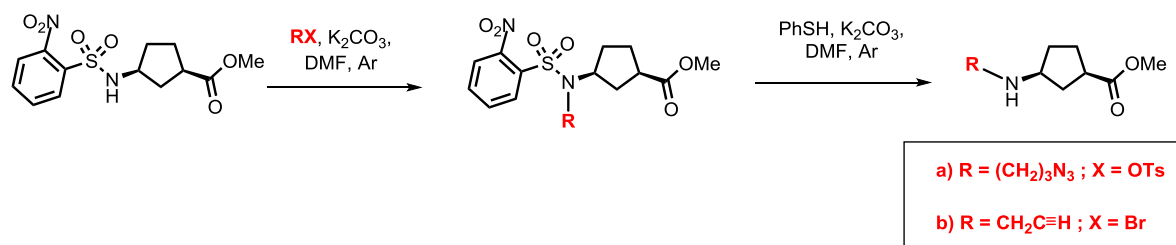


Esquema 8. Secuencia sintética seguida para la introducción del grupo nosilo.

En el caso de utilizar electrófilos más grandes, incluso tan pequeños como etilos o propargilos, la repetición de la secuencia de reacciones descrita anteriormente, se obtendría mayoritariamente el producto de O-alkilación, debido como ya se ha comentado al impedimento estérico del grupo Boc. Además, hay que recordar que si se protege primero el ácido para forzar la entrada en el nitrógeno, no se puede utilizar una base fuerte para arrancar el protón de la amina sin antes epimerizar el carbono α . Teniendo en cuenta que el protón sobre una amina secundaria no es lo suficientemente ácido como para arrancarlo con una base débil que sea inerte frente al protón del

carbono α , se necesitaba una estrategia alternativa para llevar a cabo esta N-alquilación. Para ello, optamos por el uso del grupo nosilo, el cual ha sido ampliamente descrito en la bibliografía,⁶⁴ por sus posibilidades de llevar a cabo monoalquilaciones sobre aminas utilizando condiciones básicas muy suaves o de Mitsunobu,⁶⁶ ya que el fuerte poder electroatrayente del grupo nitro en el anillo aromático hace descender notablemente el pK_a del protón amínico al estar su base conjugada más estabilizada. Teniendo esto en cuenta, la presencia de carbonato potásico (K_2CO_3) como base ($pK_{aH} = 10,3$) es suficiente para abstraer el protón sobre el nitrógeno y además, se evita además la epimerización en el carbono α (el pK_a de los protones en α a un éster ronda las 25 unidades).

A nivel sintético, en primer lugar se protegió el extremo ácido para no obtener alquilación en esa posición y a continuación se procedió a eliminar el grupo Boc inicial, mediante tratamiento con TFA, y a añadir el grupo nosilo mediante tratamiento con una base y utilizando NsCl como fuente del 2-nitrobenenosulfonato.



Esquema 9. Inserción de la cadena alquílica funcionalizada a partir del Aa protegido con el grupo nosilo.

Una vez realizada la modificación de grupo protector sobre el nitrógeno, se llevó a cabo la N-funcionalización, añadiendo un reactivo en el que estuviera presente la cadena alquílica que queríamos incluir unida a un buen grupo saliente, concretamente el 3-azidopropil-1-paratoluensulfonato y el bromuro de propargilo, que formarían parte del esqueleto del ciclotetrapéptido y del ciclooctapéptido respectivamente. Como último paso, se llevó a cabo la desprotección del grupo nosilo mediante tratamiento con tiofenol (PhSH) en medio básico, de tal manera que se pudiera comenzar la síntesis peptídica sobre los N-derivados del Acp.

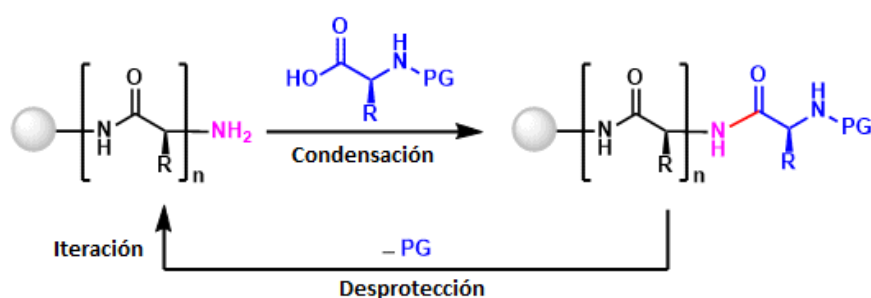
⁶⁶ O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1, 1-28.

3.5 Síntesis peptídica

3.5.1 Alternativas: Fase sólida vs. Síntesis en disolución

A la hora de plantearse la síntesis de una cadena peptídica, existen dos grandes alternativas a tener en cuenta: la síntesis en fase sólida y la síntesis en disolución.

La síntesis de péptidos en fase sólida (comúnmente conocida por sus siglas inglesas SPPS), consiste en anclar un Aa a una resina, que hace las veces de soporte sólido y de grupo protector, y sobre ella ir creciendo la cadena peptídica, realizando secuencialmente las etapas de desprotección y acoplamiento del siguiente Aa hasta llegar a la longitud deseada. La principal ventaja es la facilidad experimental del método, ya que todos los reactivos son añadidos a un cartucho en forma de disolución y luego esta disolución se filtra eliminando todo lo que no haya quedado anclado a la resina, con lo que no hay necesidad de llevar a cabo purificaciones cromatográficas. Esto también permite la utilización de un exceso de reactivos en cada paso de desprotección y acoplamiento, ya que son fácilmente eliminados con una simple filtración. Al poder forzar las condiciones de esta manera, se asegura que cada acoplamiento procede con un rendimiento prácticamente cuantitativo, lo que es muy importante ya que este proceso tiene que ser repetido en múltiples ocasiones. Al final de la síntesis, se rompe la cadena de la resina y se lleva a cabo la única purificación necesaria, para obtener el péptido en unos rendimientos globales bastante buenos. Desde el nacimiento de esta técnica hace casi 50 años,⁶⁷ se han producido importantes avances en el campo, con nuevos protocolos, resinas y agentes de acoplamiento, que han contribuido a alcanzar grandes hitos en la química sintética, como por ejemplo la síntesis *de novo* de proteínas pequeñas.⁶⁸



Esquema 10. Esquema general de la síntesis en fase sólida (SPPS).

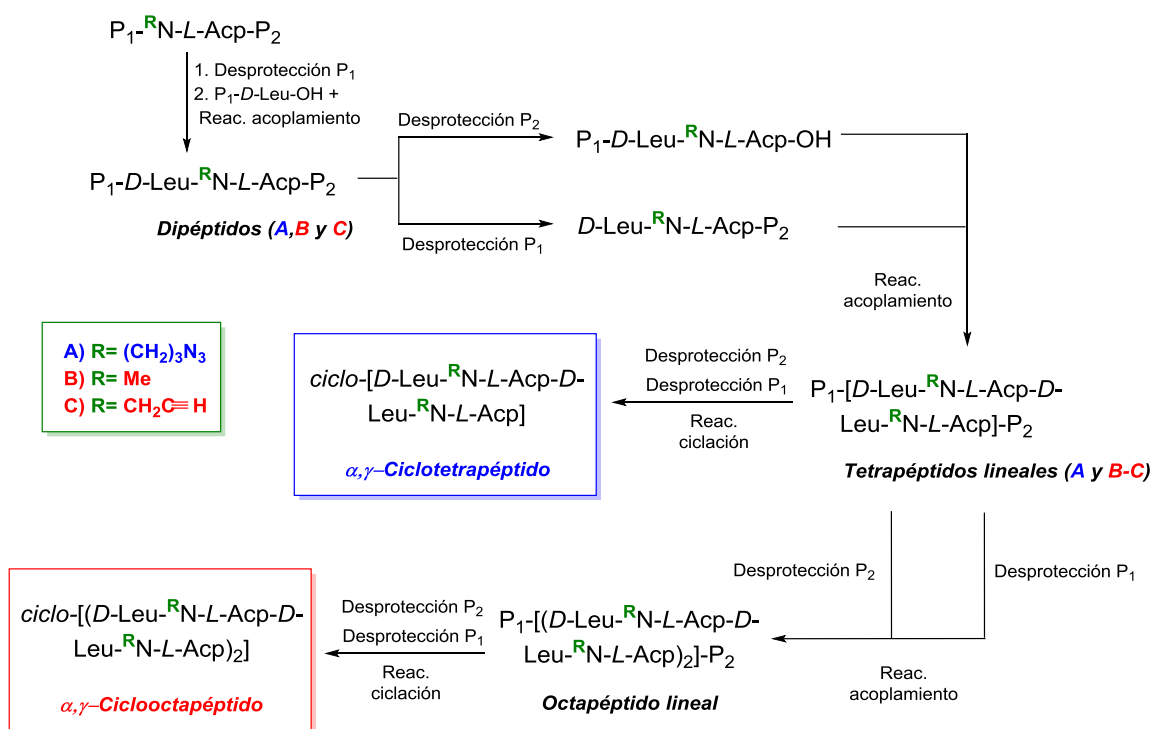
Por otro lado, la síntesis en disolución tiene como puntos fuertes la posibilidad de diseñar una síntesis más convergente y el hecho de poder caracterizar cada uno de los

⁶⁷ R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149–2154.

⁶⁸ S.B. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 338–351.

intermedios a lo largo de la síntesis. Además, en disolución los acoplamientos se llevan a cabo generalmente utilizando un único equivalente del Aa. Sin embargo, la principal desventaja de este método es la necesidad de llevar a cabo una etapa de purificación tras cada acoplamiento, lo que hace las síntesis más largas si se comparan con las de SPPS.

Teniendo en cuenta las características de este trabajo, hay que considerar también que los acoplamientos sobre aminas secundarias son bastante difíciles de llevar a cabo sobre cadenas peptídicas medianamente largas, lo que puede ser evitado si se utiliza la estrategia en disolución y se realizan estos acoplamientos al principio de la síntesis, donde pueden ser llevadas a cabo en muy buenos rendimientos. Además, uno de los factores más relevantes tenidos en cuenta para nuestra elección de método sintético es la naturaleza de los γ -Aas, cuya síntesis no es trivial, por lo que el exceso de estos que habría que utilizar en cada acoplamiento en fase sólida no parecía la opción más acertada. Además, puesto que las cadenas laterales de los α -Aas utilizados (*D*-Leu) no ofrecían ningún punto de anclaje a una resina de SPPS, nos veríamos obligados a realizar la ciclación de la cadena peptídica en disolución de todas maneras. Teniendo todo esto en cuenta, finalmente nos decantamos por realizar la síntesis de los ciclopeptidos en disolución, siguiendo la estrategia que se puede observar en el Esquema 11.



Esquema 11. Estrategia seguida para la síntesis de los α, γ -ciclopeptidos. Nótese que para el ciclotetrapéptido, el tetrapéptido lineal se construye a partir de un único dipéptido (a), mientras que en el caso del ciclooctapéptido el tetrapéptido lineal proviene de dos dipéptidos (b y c). En todos los casos $P_1 = Boc$ y $P_2 = \text{éster metílico}$.

3.5.2 Síntesis y estudio del α,γ -ciclotetrapéptido *ciclo*-[(*D*-Leu-³CN₃N- γ -Acp)₂]

En primer lugar nos propusimos la derivatización del grupo amino del isómero *L* del Acp mediante la inclusión de una cadena que contuviera una azida. Para ello se sintetizó el 3-azidopropan-1-ol a partir de su precursor comercial 3-bromopropan-1-ol mediante un simple desplazamiento nucleófilo. En este punto, aunque habría sido sintéticamente más elegante realizar un acoplamiento tipo Mitsunobu sobre el éster metílico del nosilato de Acp (Ns-*L*-Acp-OMe), la necesidad de utilizar una fosfina para realizar esta reacción lo hacía incompatible con el grupo azida, ya que se reduciría a una amina durante el proceso. Por ello se formó el tosilato a partir del alcohol para acceder a un buen grupo saliente. Tal como se comentó anteriormente el desplazamiento del tosilato se llevó a cabo utilizando DMF como disolvente para solubilizar la base empleada (K₂CO₃). El producto de alquilación se obtuvo en rendimientos cercanos al 90% y se identificó gracias a la presencia en el espectro de ¹H RMN de los dos tripletes de la cadena de 3CN₃ entre 3 y 3,5 ppm junto a las demás señales características del Ns-*L*-Acp-OMe, así como la desaparición de los dos dobletes en torno a 7,5 ppm del anillo del tosilato. Es de destacar que el epímero en el C_α solo se observa en cantidades pequeñas (en torno al 5%). Tras realizar la reacción de N-funcionalización y desproteger el nosilo se procedió con el primer acoplamiento peptídico. Dado que la reactividad de las aminas secundarias frente a la formación del enlace amida no es demasiado favorable, se utilizó un reactivo de acoplamiento muy activo, como el *N*-HATU, con el que se obtuvo el dipéptido **A** (Esquema 11) en buenos rendimientos (90-95%). La incorporación de la Leu se pudo confirmar por la aparición de señales características en el espectro de ¹H RMN, como los dobletes en torno a 0,9 ppm que son provocados por los grupos metilo de su cadena lateral. A continuación, el dipéptido resultante se dividió en dos porciones; una de ellas se trató con TFA para eliminar el grupo Boc y, tras concentrar la disolución de TFA, se utilizó sin purificaciones adicionales. Por otro lado, la otra porción de dipéptido se trató con LiOH en MeOH/H₂O para hidrolizar el éster metílico y obtener el ácido libre. Tras acidificar y extraer el dipéptido desprotegido con CH₂Cl₂ se procedió a realizar el acoplamiento en CH₂Cl₂ y utilizando *N*-HATU como agente de acoplamiento, con lo que se pudo obtener el tetrapéptido lineal **A** en un rendimiento excelente. Este tetrapéptido se caracterizó por espectrometría de masas (ESI) en la que se pudo observar el pico característico del ion molecular (*m/z*=747). En este caso el ¹H RMN no aportó ninguna información significativa, debido a la complejidad consecuencia del equilibrio conformacional de diferentes formas. A continuación, se desprotegeron ambos extremos para luego abordar la etapa final de ciclación. Esta reacción se llevó a cabo en condiciones de alta dilución, con una concentración de en torno a 0,2 mM del tetrapéptido, ya que la tendencia de estas cadenas tan cortas es la de formar ciclos más grandes, como consecuencia del acoplamiento de dos péptidos pequeños anterior a la ciclación deseada.⁶⁹ Para nuestra sorpresa, nos encontramos con que las condiciones estándar desarrolladas en el grupo de investigación en donde se utilizaba DIEA y *N*-TBTU como agente de acoplamiento

⁶⁹ R.J. Brea, L. Castedo, J.R. Granja, *Chem. Commun.* **2007**, 3267–3269.

daban lugar a mezclas complejas de productos, cuya purificación era extremadamente compleja. Por ello, decidimos cambiar el reactivo de acoplamiento a PyAOP, el cual también es ampliamente usado en el proceso de ciclación de cadenas peptídicas con muy buenos resultados, ya que reduce la racemización de centros sensibles en esta etapa.⁷⁰ La reacción de ciclación en estas condiciones fue satisfactoria, observando el desdoblamiento característico de las señales de los protones amídicos (8,4 y 7,0 ppm), los protones H α de la Leu (5,0 y 4,9 ppm) o los del H γ del Acp (4,5 y 4,25 ppm). Parecía que las señales provenían de dos especies diferentes que aparecían en una relación 4:1 (Figura 19). Con objeto de descartar la presencia de un equilibrio de interconversión lento entre una especie monomérica (7,0 ppm) y el dímero (8,4 ppm) se realizaron experimentos de dilución sin que se observara algún cambio en la integración entre ambos conjuntos de señales. Lo que si se observaba es que la señal del N-H del producto mayoritario se desplazaba a campo más alto al aumentar la dilución. Este comportamiento es típico de los equilibrios de interconversión rápidos en la escala de RMN que ya se habían observado con anterioridad con otros ciclotetrapéptidos.³¹ De este modo, a pesar de haber realizado la ciclación en alta dilución, la especie minoritaria se asignó como el ciclooctapéptido, ya que su señal de N-H aparecía en una región que indica la formación de dímero en disolución (8,4 ppm), mientras que la especie mayoritaria se identificó como el ciclotetrapéptido deseado, observando que su señal de N-H estaba desplazada a campo más alto (7,0-6,0 ppm), ya que al contar con únicamente dos posibilidades para formar puente de hidrógeno su equilibrio estaría mucho más desplazado hacia la forma monomérica.

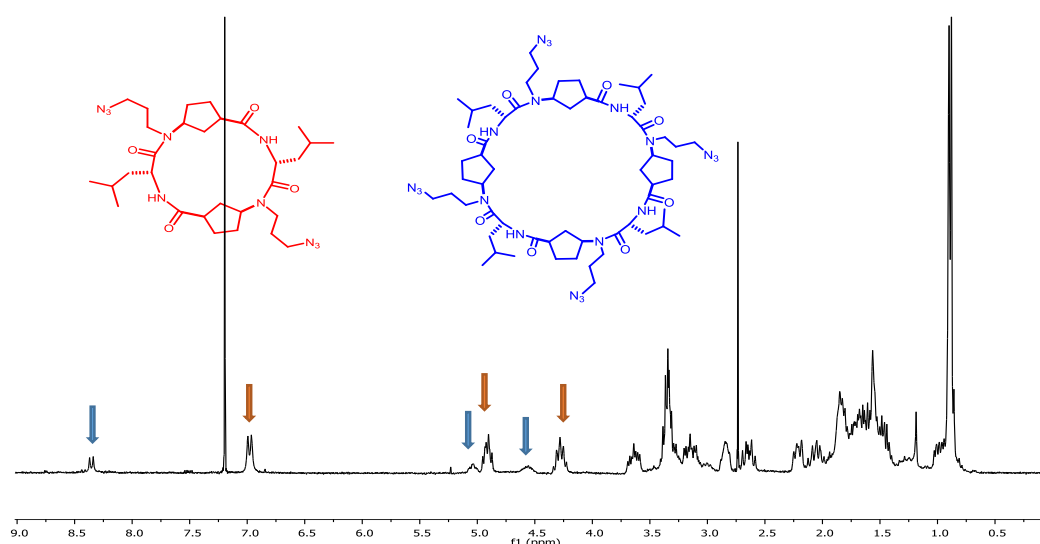


Figura 19. Espectro de ^1H RMN del crudo de la reacción de ciclación donde se observa la presencia de las dos especies cíclicas **ciclo-[(D-Leu- $^{3\text{CN}^3}\text{N}$ -L- γ -Acp) $_2$]** y **ciclo-[(D-Leu- $^{3\text{CN}^3}\text{N}$ -L- γ -Acp) $_4$]** sobreimpresionadas.

⁷⁰ F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S.A. Triolo, L.A. Carpino, S.A. Kates, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 4853-4856.

Si se tiene en cuenta que las señales del ciclooctapéptido vienen causadas por el doble de protones que en el caso del ciclotetrapéptido, se determinó que la relación entre ellos era de 8:1 a favor del producto deseado, lo cual era un valor asumible. La separación de estas dos especies cíclicas se llevó a cabo mediante HPLC en fase normal (4-6% MeOH/CH₂Cl₂ en 35 min, *t_R*= 22 min) y se obtuvieron alrededor de 40 mg del ciclo deseado puro.

A la hora de realizar estudios sobre el proceso de dimerización de este α,γ-ciclotetrapéptido mediante la realización de ¹H RMN a diferentes concentraciones, nos encontramos con que a concentraciones muy elevadas (>40 mM) las señales de los N-H presentaban desplazamientos químicos inusualmente altos para este tipo de ciclos tan pequeños. Hay que recordar que para los ciclotetrapéptidos se conocía que su dimerización estaba muy poco favorecida dado el pequeño número de enlaces por puente de hidrógeno intercíclicos que se podían formar. Sin embargo, para este compuesto en concreto, las señales tan desapantalladas hacían pensar que su habilidad para dimerizar podía ser mayor que sus antecesores N-metilados.³¹ En base a estos indicios experimentales y con la intención de conocer en profundidad el proceso de dimerización, nos propusimos obtener los parámetros termodinámicos que dirigen la formación de la especie dimérica. Para realizar el cálculo de estas variables termodinámicas se midieron los desplazamientos químicos de los N-H de las Leu a diferentes temperaturas (243-323 K) y a diferentes concentraciones (1-40 mM). A continuación se realizó un ajuste para cada grupo de datos (ver Figura 20) siguiendo una ecuación de regresión no lineal (Ecuación 1), la cual había sido descrita por LaPlanche y colaboradores y que es capaz de correlacionar las señales de los N-H con la constante de asociación (*K_a*) en un proceso de equilibrio monómero-dímero.⁷¹ La expresión matemática utilizada es:

$$\delta_{obs} = \delta_{dim} + (\delta_{mon} - \delta_{dim}) \cdot (-1 + \sqrt{1 + 8K_a C}) / (4K_a C) \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde C es la concentración del experimento, δ_{obs} es el desplazamiento químico y δ_{mon} , δ_{dim} y *K_a* se calculan al realizar el ajuste. Una vez obtenido un valor de *K_a* para cada temperatura, se correlacionó el log(*K_a*) con el inverso de la temperatura (1/T) mediante la expresión conocida como Ecuación de Van't Hoff (Ecuación 2):

$$-Log(K_a) = \left(\frac{\Delta H}{2,3R} \right) \cdot \left(\frac{1}{T} \right) - \left(\frac{\Delta S}{2,3R} \right) \quad (\text{Ecuación 2})$$

y se obtuvo por tanto el valor de ΔH y ΔS del proceso de equilibrio.

⁷¹ L.A. LaPlanche, H.B. Thompson, M.T. Rogers, *J. Phys. Chem.* **1965**, 69, 1482-1488.

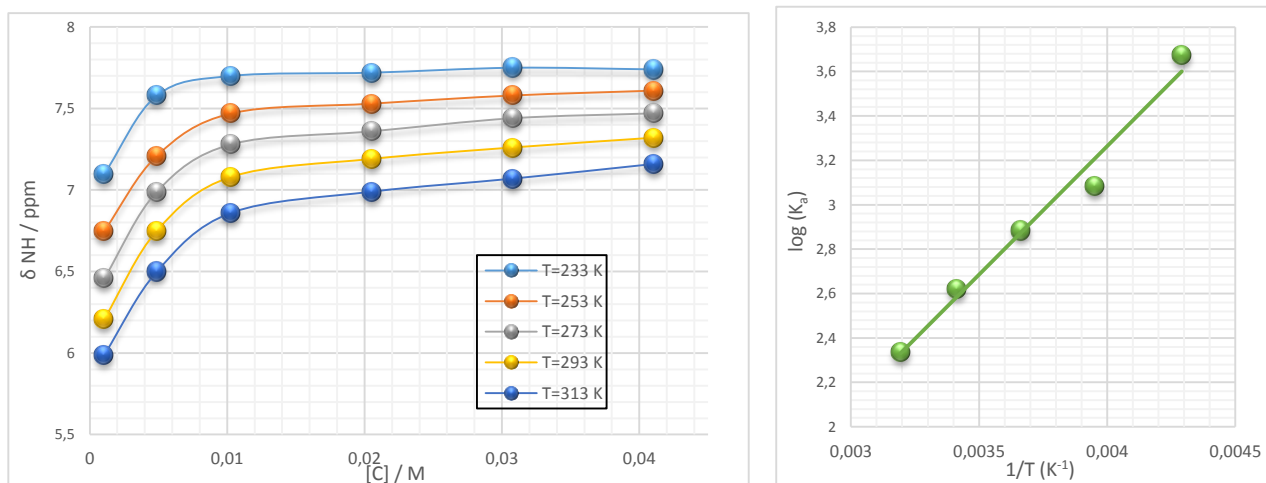


Figura 20. A la izquierda se observa la variación del desplazamiento químico de los N-H frente a la C para cada temperatura mediante el cual se pueden obtener los diferentes valores de K_a . A la derecha se muestra la representación de Van't Hoff del proceso de autoensamblaje.

De esta manera, el proceso de autoensamblaje en $CDCl_3$ dio lugar a una $K_a(298K) = 329 M^{-1}$ y los parámetros termodinámicos calculados fueron $\Delta H_{(298K)} = -22,1 kJ/mol$ y $\Delta S_{(298K)} = -26,0 J/mol \cdot K$. Estos datos ponen de manifiesto que como en trabajos anteriores el proceso de autoensamblaje está dirigido entálpicamente, mientras que está desfavorecido entrópicamente, ya que aumenta el orden del sistema al pasar de una especie monomérica a una dimérica. Además, hay que destacar que el valor de $K_a(298K)$ es en torno a 7 veces mayor que para los α,γ -ciclotetrapéptidos N-metilados previamente descritos.³¹

3.5.3 Síntesis y estudio del α,γ -ciclooctapéptido *ciclo-[(D-Leu^{Me}N-L- γ -Acp-D-Leu^{propargil}N-L- γ -Acp)]₂*

Tras obtener los derivados N-metilado y N-propargilado del L-Acp siguiendo las dos estrategias discutidas en la sección 3.4, se procedió a la formación de los dipéptidos acoplándolos con Boc-D-Leu-OH. Ambas reacciones se llevaron a cabo utilizando DIEA y el agente de acoplamiento N-HATU y procedieron en buenos rendimientos (60 y 96% respectivamente). De nuevo, ambos compuestos se identificaron en base a las señales características de RMN, como el grupo N-Me que aparece como un singlete a 2,6 ppm en el caso de dipéptido **B** o la señal de protones propargílicos a 3,4 ppm en el dipéptido **C**. A continuación, el dipéptido **B** se trató con TFA, mientras que el dipéptido **C** se trató con LiOH en MeOH/H₂O. Los dos dipéptidos desprotegidos se acoplaron entre sí utilizando en este caso N-HBTU como agente de acoplamiento, el cual es menos reactivo el N-HATU pero suficientemente activo para hacer uniones peptídicas sobre aminas primarias. La reacción transcurre con un rendimiento del 96% tras la correspondiente purificación por cromatografía en columna de gel de sílice. La presencia de un pico con la masa el ion molecular ($m/z = 633$) en espectrometría de masas confirmó la presencia

del tetrapéptido lineal **B-C** deseado. Este nuevo tetrapéptido se dividió en dos porciones y en cada una de ellas se realizó la desprotección de un extremo siguiendo el procedimiento ya descrito para los anteriores dipéptidos. Ambos tetrapéptidos se acoplaron utilizando nuevamente *N*-HBTU como agente de acoplamiento. Tras esta reacción, el octapéptido se identificó nuevamente por espectrometría de masas (m/z = Para la última etapa de ciclación, se desprotegieron ambos extremos y se procedió a utilizar las condiciones protocolarias desarrolladas en el grupo para este tipo de ciclaciones (*N*-TBTU, DIEA, $[C]$ = 1 mM),⁶⁹ las cuales resultaron satisfactorias y permitieron obtener el α,γ -ciclooctapéptido deseado en un rendimiento cercano al 60% tras la purificación por columna cromatográfica.

Tras analizar el RMN de protón se observan dos parejas de dobletes en la región entre 8 y 8,5 ppm (ver Anexo; página 67), los cuales se corresponden con los protones de los grupos N-H que, al estar tan desapantallados, indican que en disolución están involucrados en la formación enlaces de hidrógeno o, lo que es lo mismo, que el CP está en forma de dímero. Ya que ninguno de esos protones se corresponde con formas monoméricas, la explicación probable a la existencia de dos parejas de señales es la presencia de dos formas diméricas que interconvierten lentamente en la escala de tiempos de RMN. Estas dos formas derivan de la propia simetría C_2 del ciclooctapéptido, que puede dar lugar a dos dímeros no equivalentes. En primer lugar, se puede considerar un dímero “eclipsado”, en el que las unidades de Acp N-Me y N-propargiladas de un ciclooctapéptido se enfrentan con sus homólogas en el otro ciclo (Figura 21). El dímero “alternado” sería aquel en el que sus residuos N-metilados quedasen enfrentados a los residuos N-propargilados del otro ciclo. La integración de estas parejas de señales de N-H (además de otras señales como por ejemplo los N-Me en torno a 3 ppm) muestran que ambas especies cíclicas no aparecen en la misma proporción, sino en una relación de aproximadamente 3:2. Por el momento y teniendo en cuenta que este fenómeno no afecta al objetivo de este trabajo, no hemos determinado cuál de los dos dímeros es mayoritario. De todas formas, teniendo en cuenta el espectro que presentan estos dímeros, resulta muy complicada su determinación, ya que únicamente el NOE entre el H_α de un Acp con el H_γ del otro podría dar información útil para la identificación del dímero alternado. Sin embargo, tanto el H_γ del Acp N-propargilado como el H_γ del Acp N-metilado presentan el mismo desplazamiento químico, por lo que no se podría diferenciar mediante NOE la correlación intercíclica de la correlación entre ambos protones (H_γ y H_α) que formen parte de un mismo aminoácido (Figura 21, los posibles NOEs de interés se indican mediante flechas verdes). Adicionalmente, tras realizar experimentos a diferentes temperaturas y concentraciones, no se observó prácticamente variación en el desplazamiento químico de las señales de los N-H, ni siquiera al añadir una pequeña proporción de CD_3OH (<20%) como disolvente, lo que evidenciaba que el dímero tiene una constante de asociación elevada ($K_a > 10^5$).

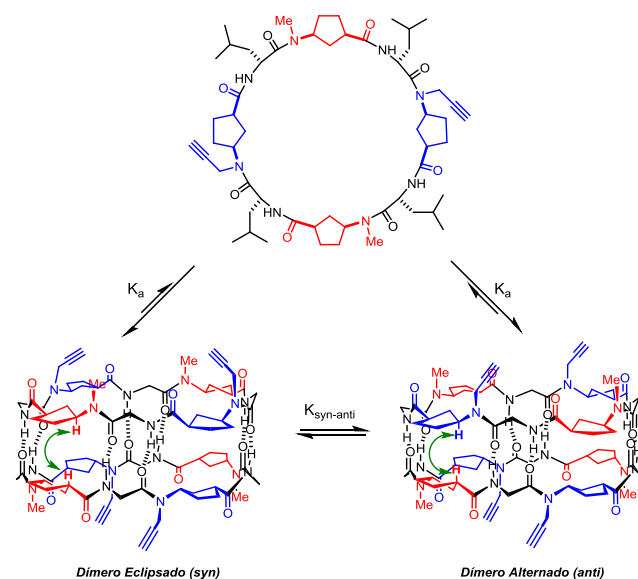


Figura 21. Esquema del proceso de dimerización ($K_a > 10^6$) del α,γ -ciclooctapéptido **ciclo-[(D-Leu-MeN-L- γ -Acp-D-Leu-propargilN-L- γ -Acp) $_2$]. A su vez las dos especies diméricas están en un equilibrio lento ($K_{\text{syn-anti}}$) entre sí, ya que en el espectro de ^1H RMN se observan ambos conformeros.**

3.6 Síntesis del dímero ciclopeptídico covalente mediante *Click Chemistry*

En este punto, lo único que nos separaba de nuestro objetivo final era realizar la reacción de unión entre ambos ciclopeptidos a través de la anteriormente comentada reacción de cicloadición 1-3 dipolar Huisgen azida-alquino. La decisión de recurrir a la química *click* se tomó en base a la versatilidad que esta ha demostrado en los últimos tiempos, habiendo ejemplos abundantes y variados en la bibliografía en los que se describe diferentes condiciones para llevarla a cabo utilizando multitud de sustratos, disolventes, temperaturas de reacción y aditivos (a saber, fuente de cobre, ligandos adicionales, agentes reductores para el reciclaje del Cu^{2+} , etc.), y en los que generalmente el rango de rendimientos obtenidos es satisfactorio en la mayoría de los casos.⁷² Sin embargo, lo que *a priori* parece un punto a favor de esta reacción, en ocasiones provoca que sea difícil encontrar las condiciones apropiadas para cada sustrato concreto, al poder decantarse por un abanico tan amplio de posibilidades sintéticas. Precisamente este último inconveniente es el que nos hemos encontrado en la etapa final del proyecto, ya que la falta de solubilidad del ciclooctapéptido N-propargilado en disolventes típicos de *Click Chemistry* de péptidos como mezclas acuosas o mezclas alcohólicas (MeOH, $i\text{PrOH}$, $i\text{BuOH}$) hizo necesaria la búsqueda de alternativas en otros disolventes orgánicos menos típicos a la hora de realizar esta reacción. Además, este hecho también condicionaba la utilización de la fuente de cobre más clásica como es el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ acompañado de *L*-ascorbato sódico para reducirlo a

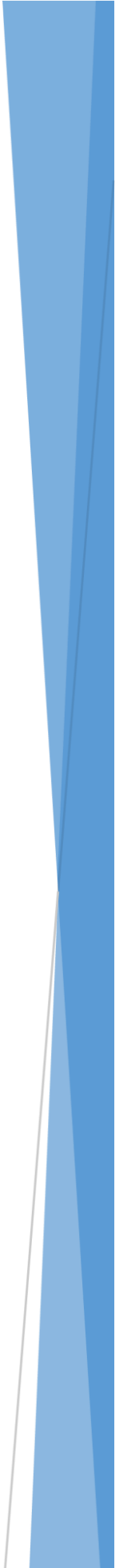
⁷² a) M. Meldal, C.W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952–3015. b) B. Schulze, U.S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 2522–2571.

Cu (I), ya que en otros disolventes orgánicos la solubilidad de estas especies es muy baja y por tanto no estarían disponibles para entrar en el ciclo catalítico. Finalmente, tras realizar un estudio exhaustivo (véase Tabla 1, en donde se muestran las condiciones más relevantes utilizadas) para encontrar las condiciones más apropiadas para la realización de esta reacción, nos encontramos con que al utilizar DMF como disolvente y CuBr en exceso como fuente de Cu (I) la reacción tenía lugar transcurridas 24 horas. Además, para intentar asegurar la reentrada del cobre en el ciclo catalítico se añadió también L-ascorbato sódico en exceso. Con esto se pudo confirmar la formación del producto deseado mediante técnicas como la espectrometría de masas (MS) en donde se observaba la aparición de dos picos en el espectro con valores de m/z de 1616 y 809 unidades, relativos a las masas del ion molecular protonado $[M+H]^+$ y al pico mitad de dicho ion $[M+H]^{2+}$, además de observar un pico a m/z 1617 que, al poseer carga +2 se corresponde con el pico mitad del dímero supramolecular (ver Anexo, página 68). Adicionalmente, en el espectro de 1H RMN se puede observar la desaparición del protón del alquino terminal del ciclooctapéptido a 2,21 ppm y el ligero desplazamiento químico a campo alto de la mayoría de las señales al compararlas con las de los CPs sin unir. No obstante, el análisis exhaustivo de este RMN no fue posible dado el grandísimo número de señales y la complejidad del sistema, que de nuevo parece presentar dos especies díméricas diferenciadas dado el elevado número de señales alrededor de 8 ppm.

	[C] ^b / mM	Disolvente	Fuente Cu	Aditivo	T / °C	t / h	Rdto
1	0,2	MeOH/H ₂ O (3:1)	CuSO ₄ · 5H ₂ O ^c (0,2 Eq)	L-Ascorbato sódico ^c (0,5 Eq)	t.a.	12	- ^a
2	0,2	DMSO/ H ₂ O (9:1)	CuSO ₄ · 5H ₂ O ^c (0,6 Eq)	L-Ascorbato sódico ^c (1,5 Eq)	t.a.	24	- ^a
3	0,25	DMF	CuSO ₄ · 5H ₂ O ^c (0,2 Eq)	L-Ascorbato sódico ^c (0,5 Eq)	t.a.	48	- ^a
4	0,5	THF	CuSO ₄ · 5H ₂ O ^c (0,6 Eq)	L-Ascorbato sódico ^c (1,5 Eq)	t.a.	20	- ^a
5	0,2	DMF (seca)	CuBr (1 Eq)	L-Ascorbato sódico ^c (1 Eq)	t.a.	24	trazas
6	0,2	DMF (seca)	CuBr (1 Eq)	L-Ascorbato sódico ^c (1 Eq)	50	15	-
7	1	DMF (seca)	CuBr (3 Eq)	L-Ascorbato sódico (3 Eq)	t.a.	24	56 %
8	2	DMF (seca)	CuBr (3 Eq)	L-Ascorbato sódico (3 Eq) 2,6-Lutidina (3 Eq)	t.a.	24	trazas

Tabla 1. a) Se recuperaron las sustancias de partida sin reaccionar. b) La concentración mostrada es la de los ciclopéptidos, que están presentes en cantidades equimolares. c) Añadido en forma de disolución acuosa.

Capítulo 4: Conclusiones

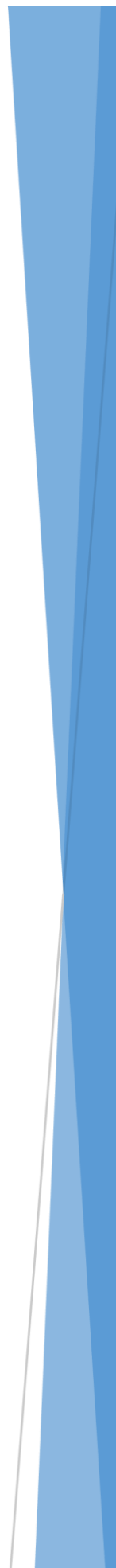


4. Conclusiones

- Se han sintetizado en forma enantiomericamente pura y en escala de multigramo los dos enantiómeros del ácido *cis*-4-ciclopentenocarboxílico (**Boc- γ -Ace-OH**), para luego reducir mediante hidrogenolisis el isómero *L* y obtener así el Boc-*L*-Acp-OH, que fue el γ -Aa que se ha empleado en este trabajo.
- Se sintetizaron derivados funcionalizados del **Boc-*L*-Acp-OH** que incluían en el átomo de nitrógeno un grupo propil-azida ($^{3\text{CN}3\text{N}}$ -Acp) o propargilo ($^{\text{propargil}}$ N-Acp) (para conectar entre sí en la última etapa de la síntesis) y un grupo metilo (para bloquear la formación de enlaces por puente de hidrógeno).
- A partir de estos derivados N-funcionalizados del Acp y combinándolos con Boc-*D*-Leu-OH se realizó la síntesis en disolución de dos α,γ -ciclopeptidos: el ciclotetrapéptido ***ciclo*-[(*D*-Leu- $^{3\text{CN}3\text{N}}$ N- γ -Acp) $_2$]** y el ciclooctapéptido de mayor tamaño ***ciclo*-[(*D*-Leu- $^{\text{Me}}$ N- γ -Acp-*D*-Leu- $^{\text{propargil}}$ N- γ -Acp) $_2$]**.
- Para el ***ciclo*-[(*D*-Leu- $^{3\text{CN}3\text{N}}$ N- γ -Acp) $_2$]** se realizó un estudio exhaustivo de su proceso de dimerización en disolventes apolares como el CHCl₃ mediante estudios de ^1H RMN, con los que, tras realizar los análisis característicos para este tipo de sistemas se concluyó que la constante de asociación (K_a) para el equilibrio monómero-dímero a temperatura ambiente (298 K) era de 329 M⁻¹, el valor más alto encontrado hasta la fecha para un α,γ -ciclotetrapéptido conteniendo γ -Acp. Además se obtuvieron los parámetros termodinámicos que guían el proceso supramolecular, siendo $\Delta H_{(298\text{K})} = -22,1 \text{ kJ/mol}$ y $\Delta S_{(298\text{K})} = -26,0 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$.
- Por último, se ha realizado una reacción de tipo *Click Chemistry* para unir covalentemente los dos α,γ -ciclopeptidos previamente sintetizados, lo que supone el primer ejemplo conocido de una cápsula supramolecular basada en ciclopeptidos que combine el uso de química covalente y supramolecular para la unión de las unidades ciclopeptídicas.

Capítulo 5:

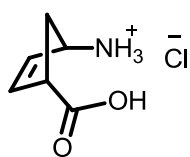
Parte Experimental



5. Parte Experimental

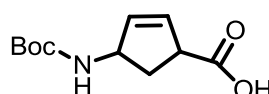
El *N*-HATU, *N*-HBTU, *N*-TBTU, PyAOP, HOBT, EDC·HCl, y la Boc-*D*-Leu-OH provienen de las casas comerciales Novabiochem, Applied Biosystems, Aldrich; Global Sales Manager y GL Biochem (Shanghai) Ltd. Los demás reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich. Todos los disolventes utilizados son de calidad de síntesis o de HPLC, utilizándolos sin purificación adicional, exceptuando el CH₂Cl₂, que se destiló utilizando CaH₂ como agente desecante, y el THF que se destiló utilizando sodio/benzofenona (siempre que se indique que se utilizan secos). Para las cromatografías en capa fina se emplearon hojas de aluminio y gel de sílice Merk (tipo 69 F254). Los reveladores empleados fueron: UV (254 nm) y disoluciones como ninhidrina (2% en EtOH) o Ce/Mo (200 mg de NH₄NO₃ + 9.6 g de molibdato amónico + 11.2 mL H₂SO₄ + 200 mL de H₂O), seguidas de calor. Para las columnas cromatográficas se utilizó como soporte sólido el gel de sílice E. Merck (tipo 60 SDS, 230,400 Mesh) y como eluyente los disolventes especificados para cada compuesto.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo en un HITACHI D-7000 o en un Agilent HPLC 1100 Series para el caso de la HPLC quiral, utilizando como columnas Agilent Zorbax RX-SIL (semi-preparative 9,4 x 250 mm, 5 micron) y Chiralpack® IC-3 (0,4 x 1 cm, DAIC 83311) respectivamente. La fase móvil utilizada se especifica en cada compuesto descrito. Los espectros de RMN se registraron en: BRUCKER WM-250, VARIAN Mercury-300, o BRUCKER DRX-500. Los disolventes empleados fueron: CDCl₃ y D₂O, utilizando la señal del TMS (δ , 0,00) o del propio disolvente como referencia. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en unidades de partes por millón (ppm). La asignación de señales para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón, **¹H RMN**, se asignaron como singlete (*s*), doblete (*d*), triplete (*t*), cuádruplete (*q*); las demás señales fueron asignadas como multiplete (*m*) o señal ancha (*br*). Los espectros de carbono **¹³C RMN**, se asignaron mediante la realización de espectros de DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) obtenidos con un ángulo de 135°. Los **FTIR** fueron medidos en un espectrofotómetro JASCO FTIR-400 (espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier), disolviendo las muestras en CHCl₃ y depositándolas sobre unas pastillas de CaF₂. Las rotaciones ópticas se midieron en un aparato JASCO.DIP-370 DIGITAL POLARIMETER utilizando una cubeta de 1 cm. Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro BRUKER BIONTOF II, mientras que los masas de alta resolución y de medidas de masas exactas se enviaron al *Servicio de Espectroscopía de Masas de la Universidad de Santiago de Compostela*.



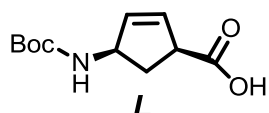
Hidrocloruro del ácido cis-4-aminociclopent-2-eno carboxílico (ClH·H-Ace-OH).

Una disolución de la azabibcilo[2.2.1]-hept-5-en-3-ona (Lactama de Vince) (25,126 g, 230,5 mmol) en una disolución acuosa de HCl (10%, 800 mL) se agitó durante 17 h a t.a. A continuación, la disolución se concentró a sequedad para dar lugar a un sólido blanco, que se utilizó en el siguiente paso sin mayor purificación. [37,200 g; 99%; R_f = 0,25 (50% MeOH/ CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (250 MHz, D₂O, δ 6,18 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 6,04 – 5,79 (m, 1H), 4,36 (s, 1H), 3,81 – 3,60 (m, 1H), 2,63 (dt, J = 14,6 y 8,5 Hz, 1H), 2,03 (dt, J = 14,6 y 4,9 Hz, 1H).³³



Ácido cis-4-amino-N-t-butiloxycarbonilciclopent-2-enocarboxílico (Boc- γ -Ace-OH).

El hidrocloruro del ácido cis-4-aminociclopent-2-enocarboxílico (37,200 g, 228,2 mmol) se disolvió en una mezcla de H₂O y dioxano (1:1, 600 mL). A continuación se añadió DIEA (120,5 mL, 691,0 mmol) y finalmente Boc₂O (62,883 g, 288,1 mmol) en dos porciones, con un intervalo de 15 minutos entre ellas. Esta mezcla se agitó durante 20 h y posteriormente se acidificó con una disolución acuosa de HCl (10%) hasta alcanzar pH=3. se extrajo la fase acuosa con CH₂Cl₂ (3x100 mL) y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad, dando lugar **Boc- γ -Ace-OH** como un sólido blanco. [41,441 g, 80%, R_f = 0,33 (50% MeOH/ CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 10,8 (s, 1H, CO₂H), 6,30 y 4,98 (s, 1H, NH), 5,90 (s, 2H, CH=CH), 4,80 – 4,51 (m, 1H, H _{γ}), 3,51 (s, 1H, H _{α}), 2,54 (m, 1H, CH₂), 1,43 (s, 9H, Boc).³³

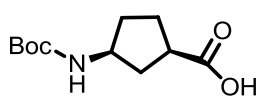


Ácido (1R,4S)-cis-4-amino-N-t-butiloxycarbonilciclopent-2-enocarboxílico (L-Boc- γ -Ace-OH).

La mezcla racémica del **Boc- γ -Ace-OH** (41,580 g, 183,2 mmol) se disolvió en CHCl₃ (630 mL), a continuación se añadió lentamente y agitando (+)-1-feniletanamina (11,7 mL, 91,6 mmol) y por último hexano (157 mL), evitando la precipitación rápida de la sal. Esta mezcla se dejó cristalizar durante una semana, tiempo tras el cual apareció un precipitado blanco en su seno, el cual se filtró a vacío y se lavó repetidamente con CHCl₃. A continuación, el sólido se suspendió en CH₂Cl₂ (350 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3x250 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y concentró a vacío. El sólido obtenido estaba enriquecido en el enantiómero (-) o L del γ -Aa **Boc- γ -Ace-OH** ($[\alpha]_D^{298}$ = -12,5). Tras repetir este proceso tres veces, reduciendo progresivamente las proporciones de hexano y aumentando hasta 1 equivalente de la amina quiral empleada, hasta que el sólido obtenido tenía $[\alpha]_D^{298}$ = -49,1 (99% e.e.). [20,320 g, R_f = 0,71 (50% CH₂Cl₂/MeOH)]. ¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 10,8 (s, 1H, CO₂H), 6,30 y 4,98 (s, 1H, NH), 5,90 (s, 2H, CH=CH), 4,80 – 4,51 (m, 1H, H _{γ}), 3,51 (s, 1H, H _{α}), 2,54 (m, 1H, CH₂), 1,43 (s, 9H, Boc).

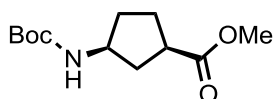
Por otra parte, las aguas madres de la primera cristalización se concentraron, y el sólido resultante se trató con (-)-1-feniletanamina, repitiéndose el mismo proceso que el descrito para el isómero levorotatorio. Tras repetir nuevamente 3 veces la

cristalización se obtuvo el ácido **(1S,4R)-cis-4-amino-N-t-butiloxycarbonilciclopent-2-eno carboxílico (D-Boc-γ-Ace-OH)**. $[[\alpha]_D^{298} = +46,3]$.³³



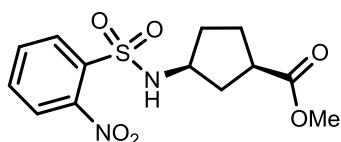
Ácido (1R,3S)-3-amino-N-t-butiloxycarbonilciclopentano carboxílico (L-Boc-γ-Acp-OH). El aminoácido **L-Boc-γ-Ace-OH** (2,880 g, 12,7 mmol) se disolvió en EtOH (64 mL). A continuación

la disolución resultante se desgasificó y se añadió 10% Pd/C en polvo (1,35 g, 1,27 mmol). Por último se aplicó la presión de dos globos de H₂ y la mezcla se dejó agitando durante 26 horas. Seguidamente, se filtró sobre celita lavando repetidamente con EtOH y las aguas madres se concentraron a sequedad para obtener un sólido blanco que se utilizó en el siguiente paso sin más purificación. [2,900 g; 99%; R_f=0,55 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 250 MHz, δ) 6,34 y 5,03 (m, 1H), 4,15 – 3,73 (m, 1H), 2,81 (m, 1H), 2,18 (m, 1H), 2,05 – 1,50 (m, 5H), 1,39 (s, 9H). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 230 ([MH]⁺, 1), 174 ([MH]⁺ - (t-butil), 45), 130 ([MH]⁺ - Boc, 100), 112 ([MH]⁺ - (OH), 88).³³



(1R,3S)-3-amino-N-t-butoxycarbonilciclopentanocarboxilato de metilo (L-Boc-γ-Acp-OMe). El aminoácido **L-Boc-γ-Acp-OH** (2,050 g, 8,73 mmol) del experimento anterior se disolvió en

MeOH (44 mL) y se añadieron en este orden; EDC·HCl (2,510 g, 13,1 mmol), HOBT (1,770 g, 13,1 mmol) y DMAP (1,600 g, 13,1 mmol). La disolución resultante se agitó durante 2 h bajo atmósfera de argón. Transcurrido ese tiempo, esta disolución se concentró en el rotavapor y se redisolvió el residuo en CH₂Cl₂ (100 mL) para lavar con disoluciones acuosas de HCl (5%, 3x50 mL), de NH₄Cl (sat., 2x50 mL) y por último de NaHCO₃ (sat., 3x50 mL). Tras secar (MgSO₄ anhidro), filtrar y concentrar, el sólido resultante se purificó mediante cromatografía en columna (5-20% AcOEt/Hexano) para dar el producto deseado como un sólido blanco. [1,610 g; 76%; R_f= 0,78 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 300 MHz). δ 4,93 y 4,45 (br, 1H, NH), 4,04 (br, 1H, H_γ), 3,67 (2s, 3H, CO₂Me), 2,85-2,79 (br, 1H, H_α), 1,43 (s, 9H, Boc). **¹³C-RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 177,2 (C=O), 155,3 (C=O), 78,9 (Q), 51,9 (CH₃), 51,8 (CH), 41,6 (CH), 36,4 (CH₂), 32,0 (CH₂), 28,3 (CH₃), 27,8 (CH₂). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 280 ([M+Na]⁺, 100), 281 ([MH + Na]⁺, 15). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 266 ([M+Na]⁺, 100).



(1R,3S)-3-amino-N-(o-nosil)-ciclopentanocarboxilato de metilo (Ns-L-γ-Acp-OMe). Una disolución del **L-Boc-γ-Acp-OMe** (2,616 g, 10,7 mmol) en CH₂Cl₂ (27 mL) se trató con

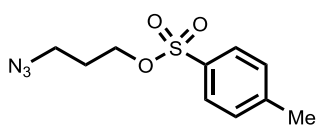
TFA (27 mL). Tras agitar durante 15 minutos, la disolución

se concentró en el rotavapor y luego a alto vacío durante 2 h. El sólido resultante se redisolvió en CH₂Cl₂ seco (53 mL) y se añadió DIEA (5,75 mL, 32,9 mmol), seguida de cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo (2,557 g, 16,1 mmol). La mezcla se mantuvo con agitación durante 22 h bajo atmósfera de argón. A continuación se lavó con las disoluciones acuosas de HCl (5%, 2x50 mL) y de NaHCO₃ (sat., 2x50 mL), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y concentró a vacío. Tras realizar una purificación mediante

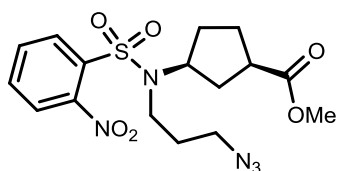
cromatografía en columna (15-50% AcOEt/Hexano) se obtuvo **Ns-L-γ-Acp-OMe** como un sólido amarillo. [2,807 g; 80%; R_f = 0,68 (50% AcOEt/Hexano)]. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8,29 (d, J = 8,8 Hz, 2H, Ar), 8,02 (d, J = 8,8 Hz, 2H, Ar), 5,84 y 5,33 (d, J = 6,9 y 7,2 Hz, 1H, NH), 3,61 y 3,57 (2s, 3H, CO_2Me), 3,78 (br, 1H, H_γ), 2,76 (m, 1H, H_α). $^{13}\text{C RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 176,6 (C=O), 150,0 (Ar), 133,7 (Ar), 133,4 (Ar), 132,8 (Ar), 130,7 (Ar), 125,3 (Ar), 55,5 (CH_3), 52,8 (CH), 41,6 (CH), 36,4 (CH_2), 33,2 (CH_2), 27,9 (CH_2). **M.S. (ESI)** [m/z (%)]: 328 ($[\text{M}]^+$, 100).



3-azidopropan-1-ol.⁷³ Sobre una disolución de 3-bromo-1-propanol (2,5 mL, 28,6 mmol) en una mezcla de EtOH/ H_2O (1:1, 52 mL) se añadió NaN_3 (7,436 g, 114,0 mmol) y se agitó durante 24 h a 70°C. El EtOH se evaporó a presión reducida y la fase acuosa resultante se extrajo con CH_2Cl_2 (3x20 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y dio lugar a un aceite transparente tras evaporar el disolvente. [2,699 g, 92%, R_f = 0,31 (25% AcOEt/Hexano)]. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 3,69 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3,40 (t, J = 6,6 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 2,42 (ancho, 1H, OH), 1,79 (m, J = 6,3, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).



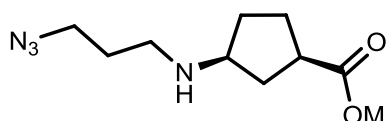
3-azidopropil-1-*p*-toluensulfonato. 3-azidopropan-1-ol (0,909 g, 9,0 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (36 mL) y se añadieron Et_3N (2,51 mL, 18,0 mmol) y cloruro de *p*-toluensulfonilo (1,800 g, 9,5 mmol). La mezcla se dejó bajo agitación *overnight* y luego se lavó con H_2O (grado Milli-Q, 2x25 mL), se secó con MgSO_4 anhidro y se filtró. Tras concentrar en el rotavapor, el aceite resultante se purificó mediante cromatografía en columna (0-35% AcOEt/Hexano), lo que permitió obtener el producto deseado como un aceite transparente. [2,135 g, 93%, R_f = 0,51 (25% AcOEt/Hexano)]. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,78 (d, J = 8,3 Hz, 2H, Ar), 7,35 (d, J = 7,9 Hz, 2H, Ar), 4,09 (t, J = 6,0 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OTs}$), 3,36 (t, J = 6,5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 2,44 (s, 3H, CH_3), 1,87 (m, J = 6,2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$). $^{13}\text{C RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 145,0 (Ar), 132,7 (Ar), 129,9 (Ar), 127,9 (Ar), 67,0 (CH_2), 47,3 (CH_2), 28,4 (CH_2), 21,6 (CH_3).



(1*R*,3*S*)-3-amino-*N*-(*o*-nosil)-*N*-(3-azidopropil)ciclopentanocarboxilato de metilo (Ns-³CN₃N-L-γ-Acp-OMe). El aminoácido protegido **Ns--L-γ-Acp-OMe** (0,531 g, 1,6 mmol) se disolvió en DMF seca (8,1 mL) y se trató con K_2CO_3 (1,790 g, 13,0 mmol) y **3-azidopropil-1-*p*-toluensulfonato** (3,724 g, 14,6 mmol) previamente sintetizado. La mezcla se agitó durante 24 horas bajo argón y luego la DMF se evaporó bajo alto vacío. El residuo resultante se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con H_2O (grado Milli-Q, 2x15 mL) y disolución acuosa de NaCl (sat., 2x15 mL), se secó con MgSO_4 (anhidro) y se filtró. El residuo

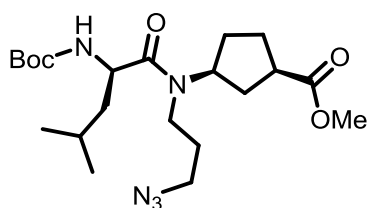
⁷³M. Bertoldo, G. Zampano, F. La Terra, V. Villari, V. Castelvetro, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 388-398.

resultante se purificó mediante cromatografía rápida en columna de gel de sílice (10-50% AcOEt/Hexano) para dar lugar al aminoácido funcionalizado objetivo. [0,638 g; 97%; R_f = 0,33 (50% AcOEt/Hexano)]. $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz). δ 7,95 (m, 1H, Ar), 7,75 – 7,52 (m, 3H, Ar), 4,18 (br, 1H, H_γ), 3,59 (2s, 3H, CO_2Me), 3,47 – 3,09 (m, 4H, N- CH_2 y $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 3,09 – 2,64 (m, 1H, H_α). $^{13}\text{C RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 175,9 (C=O), 148,1 (Ar), 133,8 (Ar), 133,2 (Ar), 131,8 (Ar), 130,5 (Ar), 124,1 (Ar), 58,7 (CH_3), 51,9 (CH), 48,9 (CH_2), 41,6 (CH_2), 40,5 (CH), 32,4 (CH_2), 30,7 (CH_2), 28,5 (CH_2), 26,8 (CH_2). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 434 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 412 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 60).



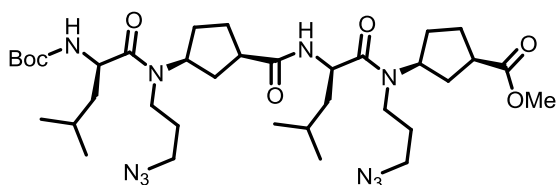
(1R,3S)-3-amino-N-(3-azidopropyl)-ciclopentanocarboxilato de metilo ($^{3\text{CN}3}\text{N-L-}\gamma\text{-Acp-OMe}$). El aminoácido N-funcionalizado **Ns- $^{3\text{CN}3}\text{N-L-}\gamma\text{-Acp-OMe}$** (0,715, g, 1,7 mmol) se disolvió en DMF seca (8,7 mL). A continuación se

añadió K_2CO_3 (1,202 g, 8,7 mmol) y PhSH (0,71 mL, 7,0 mmol). La mezcla se agitó *overnight* para luego eliminar la DMF mediante concentración a alto vacío. La mezcla obtenida se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con H_2O (grado Milli-Q, 2x25 mL) y una disolución acuosa de NaCl (sat., 2x25 mL). Tras secar la disolución resultante con MgSO_4 (anhidro), filtrar y concentrar, la purificación del residuo obtenido se llevó a cabo mediante cromatografía en columna (0-8% MeOH/ CH_2Cl_2) para obtener finalmente el producto deseado como un sólido blanco. [0,321 g; 81%; R_f = 0,13 (5% MeOH/ CH_2Cl_2)]. $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz). δ 7,11 (br, 1H, NH), 3,60 (2s, 3H, CO_2Me), 3,45 (t, J = 6,5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 3,35 – 3,22 (m, 1H, H_γ), 2,84 (t, J = 7,2 Hz, 2H, N- CH_2), 2,72 (m, 1H, H_α), 2,25 (m, J = 7,2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$). $^{13}\text{C RMN}$ 175,7 (C=O), 59,1 (CH_3), 51,9 (CH), 48,9 (CH_2), 44,7 (CH_2), 42,0 (CH), 34,3 (CH_2), 29,9 (CH_2), 27,3 (CH_2), 27,2 (CH_2). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 227 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 156 ($[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_3]^+$, 10)



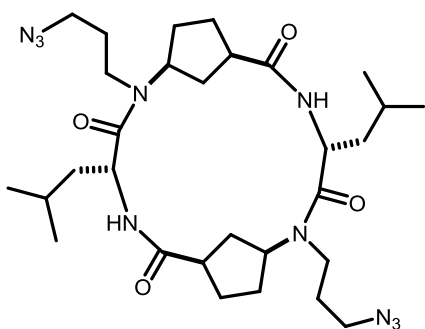
Boc-[D-Leu- $^{3\text{CN}3}\text{N-L-}\gamma\text{-Acp}$]-OMe. El derivado de Acp $^{3\text{CN}3}\text{N-L-}\gamma\text{-Acp-OMe}$ (0,320g, 1,4 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 seco (5 mL) y a continuación se añadió DIEA (0,50 mL, 2,8mmol). En otro balón se disolvió Boc-D-Leu-OH (0,346 g, 1,5 mmol) en CH_2Cl_2 seco (5 mL) y luego se añadieron por este orden DIEA (0,67 mL, 3,6 mmol) y N-

HATU (0,820 g, 2,0 mmol). Esta segunda disolución se transfirió sobre la que contenía el Acp y la disolución resultante se agitó bajo atmósfera de argón durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se lavó con disoluciones acuosas de NaHCO_3 (sat, 3x20 mL) y de HCl (5%, 3x20 mL), se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida en columna de gel de sílice (15-20% AcOEt/Hexano) y el producto deseado se obtuvo como un aceite transparente. [0,552 g, 92%, R_f = 0,68 (5% MeOH/ CH_2Cl_2)]. **M.S. (ESI)** [m/z (%): 440 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 462 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 15)



Boc-[(D-Leu-^{3CN3}N-L-γ-Acp)₂]-OMe. El dipéptido **Boc-[D-Leu-^{3CN3}N-L-γ-Acp]-OMe** previamente obtenido se dividió en dos porciones. La primera de ellas (0,280 g, 0,64 mmol) se disolvió en una mezcla

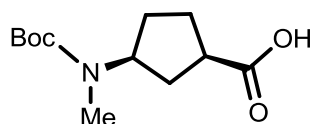
MeOH/H₂O (3:1, 13 mL) se trató con LiOH (0,077 g, 3,2 mmol). Tras agitar durante 1 hora, el MeOH se evaporó a presión reducida y la fase resultante se acidificó con una disolución acuosa de HCl (5%) hasta pH= 2. La disolución acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (4x15 mL) y se secaron los extractos orgánicos con MgSO₄ (anhidro). Luego se filtraron y concentraron a sequedad para dar el **Boc-[D-Leu-^{3CN3}N-L-γ-Acp]-OH** como una espuma blanca. Por otra parte, la porción restante del dipéptido anteriormente citado (0,280 g, 0,64 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (3,5 mL) y luego se trató con TFA (3,5 mL). Tras agitar la mezcla durante 15 minutos a t.a., se evaporó a sequedad en el rotavapor. El residuo resultante se redisolvió en CH₂Cl₂ y se concentró nuevamente a sequedad, repitiendo este proceso hasta 3 veces. Adicionalmente, el residuo se secó bajo alto vacío durante 3 h más. Tras ese tiempo, se redisolvió en CH₂Cl₂ (3 mL) y se añadió DIEA (0,224 mL, 1,3 mmol). Paralelamente, la primera porción se disolvió en CH₂Cl₂ seco (5,5 mL) y se añadieron DIEA (0,45 mL, 2,6 mmol) y *N*-HATU (0,293 g, 0,77 mmol) por este orden. Finalmente, esta mezcla se transfirió sobre la primera y se agitó la disolución resultante durante 3 h bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo, la mezcla se lavó con disoluciones acuosas de NaHCO₃ (sat, 3x20 mL) y de HCl (5%, 3x20 mL). A continuación la fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y evaporó a vacío. La espuma resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (30-50% AcOEt/Hexano) dando lugar al tetrapéptido indicado en forma de espuma. [0,475 g, 99%, R_f= 0,30 (50% AcOEt/Hexano)]. **M.S. (ESI) [m/z (%)]** 769 ([M+Na]⁺, 100), 747 ([M+H]⁺, 30).



c-[(D-Leu-^{3CN3}N-L-γ-Acp)₂]. El tetrapéptido **Boc-[(D-Leu-^{3CN3}N-L-γ-Acp)₂]-OMe** (0,383 g, 0,52 mmol) fue disuelto en una mezcla MeOH/H₂O (3:1, 10,8 mL) y a continuación se trató con LiOH (0,062 g, 2,6 mmol). Tras agitar durante 1 h, el MeOH se evaporó a presión reducida y la disolución acuosa resultante se acidificó con una disolución acuosa de HCl (5%) hasta pH= 2. Tras extraer con CH₂Cl₂ (4x15 mL), los extractos

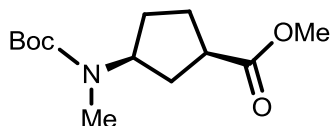
orgánicos combinados se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y concentraron para dar una espuma. Una fracción de dicha espuma (0,097 g, 0,13 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (1,3 mL) y se trató con TFA (1,3 mL). Tras agitar durante 15 min, el TFA se eliminó usando el protocolo anteriormente detallado. Seguidamente, el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (660 mL) y se añadió DIEA (0,138 mL, 0,81 mmol) y PyAOP (0,065 g, 0,13 mmol). Esta mezcla se agitó bajo atmósfera de argón y tras 14 h todavía se observaba la presencia de sustancia de partida en el espectro de M.S., por lo que se añadió más DIEA

(0,046 mL, 0,27 mmol) y PyAOP (0,033 g, 0,067 mmol). 5 h después de la adición, el disolvente se concentró a volumen reducido (aproximadamente un 5%) de su volumen inicial y se lavó con disoluciones acuosas de NH_4Cl (sat., 2x20 mL) y de NaHCO_3 (sat., 2x20 mL). Se secó la disolución resultante con MgSO_4 (anhidro), se filtró y concentró. El sólido resultante se purificó mediante HPLC (Fase Normal, 4-6% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ en 35 min, $t_R = 22$ min) para dar el ciclotetrapéptido **c-[(D-Leu- $^{3\text{CN}3}\text{N-L-}\gamma\text{-Acp})_2]$** como un sólido blanco. [33,1 mg, 41%, $R_f = 0,34$ (5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$)]. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz). δ 7,32 (m, 1H, NH), 4,95 (m, 1H, Leu- H_α), 4,28 (m, 1H, Acp- H_γ), 3,67 (m, 1H), 3,35 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 3,15 (m, 1H), 2,91 (br, 1H), 2,61 (m, 1H), 2,23 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 1,84 (m, 2H), 1,67 (m, 2H), 1,47 (m, 3H), 0,92 (m, 6H, Leu- CH_3) $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz). δ 177,1 (C=O), 174,6 (C=O), 56,4 (CH), 48,8 (CH), 48,1 (CH), 41,6 (CH_2), 41,2 (CH_2), 40,8 (CH_2), 31,1 (CH_2), 28,5 (CH_2), 25,8 (CH_2), 24,9 (CH_2), 23,3 (CH), 22,2 (CH_3). **FT-IR** (293 K, CHCl_3) 1668 (amida Ia), 1624 (amida Ib), 1528 (amida II) cm^{-1} . **H.R.M.S. (ESI)** Masa calculada: 615,4089. Masa encontrada: 615,4087.



Ácido (1R,3S)-3-amino-N-metil-ciclopentanocarboxílico (Boc- $^{\text{Me}}\text{N-L-}\gamma\text{-Acp-OH}$). Una disolución enfriada en un baño de agua-hielo del **Boc-L- $\gamma\text{-Acp-OH}$** (0,925 g, 4,0 mmol) en THF seco (20mL) se trató con NaH (60%, 0,485 g, 12,1 mmol) y la

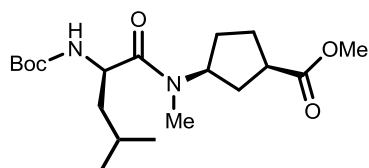
mezcla se agitó durante 30 min, transcurrido ese tiempo se añadió MeI (0,75 mL, 12,1 mmol). Tras agitar durante 60h, se añadió H_2O (10 mL) a la mezcla de reacción y se evaporó el THF a vacío. La disolución acuosa se lavó con Et_2O (3x10 mL), se ajustó el pH con una disolución acuosa de HCl (5%) hasta alcanzar un pH en torno a 3 y finalmente se extrajo con CH_2Cl_2 (4x10 mL). Los extractos orgánicos se secaron con MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad. El producto deseado **Boc- $^{\text{Me}}\text{N-L-}\gamma\text{-Acp-OH}$** se obtuvo como un aceite que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz). δ 10,45 (br, 1H, CO_2H), 4,50 (br, 1H, H_γ), 2,90-2,30 (m, 4H, H_α y 3H N-Me), 1,44 (s, 9H, Boc).



(1R,3S)-3-amino-N-metil-ciclopentanocarboxilato de metilo ($^{\text{Me}}\text{N-L-}\gamma\text{-Acp-OMe}$). Una disolución de **Boc- $^{\text{Me}}\text{N-L-}\gamma\text{-Acp-OH}$** (0,780 g, 3,21 mmol) en MeOH (16 mL), se trató, en este orden, con EDC-HCl (0,923 g, 4,81 mmol), HOBT (0,650

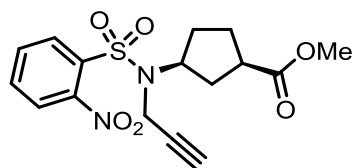
g, 4,81 mmol) y DMAP (0,587 g, 4,81 mmol). Tras una hora de agitación a t.a., se concentró la disolución a sequedad, se redisolvió el residuo en CH_2Cl_2 y se lavó con disoluciones acuosas de NaHCO_3 (sat., 2x15 mL) y de HCl (5%, 2x15 mL). Finalmente la disolución se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró, para luego purificar el residuo obtenido mediante cromatografía rápida en columna de gel de sílice (5-20% $\text{AcOEt}/\text{Hexano}$) para dar el **Boc- $^{\text{Me}}\text{N-L-}\gamma\text{-Acp-OMe}$** como un aceite transparente. [0,607 g; 74%; $R_f = 0,57$ (5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$)]. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz). δ 4,42 (br, 1H, H_γ), 3,58 (s, 3H, CO_2Me) 2,90-2,63 (m, 4H, H_α y NMe), 1,34 (s, 9H, Boc). $^{13}\text{C-RMN}$ (250 MHz, CDCl_3):

δ 176,1 (C=O), 155,5 (C=O), 79,1 (Q), 69,5 (CH₃), 51,5 (CH), 41,1 (CH), 28,2 (CH₂), 28,0 (CH₂), 27,1 (CH₃). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 280 ([M+Na]⁺, 100), 281 ([MH + Na]⁺, 15).



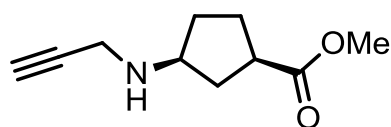
Boc-[D-Leu-MeN-L-γ-Acp]-OMe. **Boc-MeN-L-γ-Acp-OMe** (0,317 g, 1,2 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (6,2 mL) y se trató TFA (6,2 mL). La disolución se agitó al aire y a t.a. durante 15 min y luego el TFA se eliminó siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. El residuo

obtenido se disolvió en CH₂Cl₂ seco (12,4 mL) y se trató con DIEA (1,38 mL, 7,4 mmol), Boc-D-Leu-OH (0,305 g, 1,3 mmol) y *N*-HATU (0,547 g, 1,44 mmol). La disolución resultante se agitó durante 2 h a t.a. bajo atmósfera de argón y tras ese tiempo se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 2x30 mL) y de NaHCO₃ (sat., 2x30 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ (anhidro), se filtró y concentró. Por último se llevó a cabo una purificación mediante cromatografía rápida en columna de gel de sílice (20-40% AcOEt/Hexano) con lo que se obtuvo el dipéptido **Boc-[D-Leu-MeN-L-γ-Acp]-OMe** como una espuma transparente. [0,260 g; 60%, R_f = 0,77 (10% MeOH/ CH₂Cl₂)]. **M.S. (ESI)** [m/z (%): 371 ([M+H]⁺, 100), 393 ([M+Na]⁺, 60).



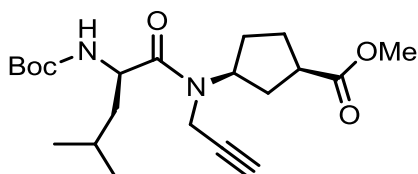
(1R,3S)-3-amino-N-(o-nosyl)-N-propargil-ciclopentanocarboxilato de metilo (Ns-propargilN-L-γ-Acp-OMe). El **Ns-N-L-γ-Acp-OMe** (1,259 g, 3,8 mmol) se disolvió en DMF seca (19 mL) y se trató con K₂CO₃ (2,100 g, 15,2 mmol) y bromuro de propargilo (80%, 1,978 g, 13,3 mmol).

La mezcla se agitó durante 5 h bajo atmósfera de argón y la DMF se evaporó aplicando alto vacío. El residuo se redisolvió en CH₂Cl₂ (25 mL) y se lavó con H₂O (grado Milli-Q, 3x25 mL) y una disolución acuosa de NaCl (sat., 3x25 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró en el rotavapor. La purificación se llevó a cabo mediante columna de gel de sílice (20-30% AcOEt/Hexano) que permitió obtener el producto indicado, que se aisló como un aceite amarillo viscoso. [1,124 g; 81%; R_f = 0,65 (50% AcOEt/Hexano)]. **¹H-RMN** (CDCl₃, 300 MHz). δ 8,32 (d, J = 8,9 Hz, 2H, Ar), 8,09 (d, J = 8,9 Hz, 2H, Ar), 7,73 y 6,60 (br, 1H, NH), 4,39 (m, 1H, CH_v), 4,14 (s, 2H, CH₂-N-Acp), 2,77 (m, 1H, C≡H), 2,15 (m, 1H, CH_α). **¹³C-RMN** (250 MHz, CDCl₃). δ 176,1 (C=O) 150,0 (Q), 146,0 (Q), 128,7 (Ar), 124,1 (Ar), 78,8 (Q), 73,5 (CH₃), 58,7 (CH₂), 52,3 – 51,3 (CH₂), 41,6 – 40,6 (CH₂), 35,5 (CH), 32,9 (CH), 28,6 – 28,4 (CH), 26,9 (CH). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 240 ([M + H – Ns,propargilN]⁺, 100), 367 ([M+H]⁺, 70).



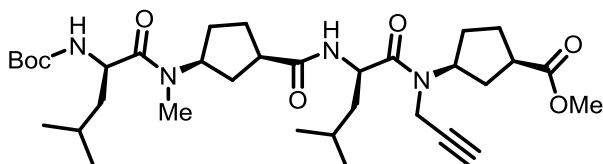
(1R,3S)-3-amino-N-(propargyl)-ciclopentanocarboxilato de metilo (propargilN-L-γ-Acp-OMe). Una disolución de **Ns-propargilN-L-γ-Acp-OMe** (1,120 g, 3,1 mmol) en DMF seca (31 mL) se trató K₂CO₃ (2,142 g, 15,5 mmol) y PhSH (1,25 mL, 12,4 mmol). Tras 18 h, la DMF se eliminó mediante

evaporación a alto vacío y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (100 mL) para luego lavar con H_2O (grado Milli-Q, 2x15 mL) y una disolución acuosa de NaCl (sat., 2x15 mL). A continuación, la fase orgánica se secó con MgSO_4 (anhidro), se filtró y se concentró a vacío. La purificación se realizó mediante cromatografía rápida en columna de gel de sílice (25-40% AcOEt/Hexano) para dar lugar al Aa *propargil***N-L- γ -Acp-OMe**. [0,390 g; 69%; R_f = 0,26 (75% AcOEt/Hexano)]. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz). δ 3,62 (s, 3H, CO_2Me), 3,35 (d, J = 2,4 Hz 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3,28 (m, 1H, H_γ), 2,91 and 2,75 (m, 1H, H_α). $^{13}\text{C-RMN}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 176,3 (C=O), 82,2 (Q), 71,1 (CH), 57,5 (CH_3), 51,6 (CH), 42,1 (CH), 36,5 (CH_2), 36,2 (CH_2), 32,1 (CH_2), 27,4 (CH_2). **M.S. (ESI)** [m/z (%): 182 [(M+H) $^+$, 100].



Boc-[D-Leu-*propargil*N-L- γ -Acp]-OMe.** *propargil***N-L- γ -Acp-OMe** (0,390 g, 2,2 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (21,5 mL) y se trató con DIEA (1,50 mL, 8,6 mmol), Boc-D-Leu-OH (0,548 g, 2,4 mmol) y por último *N*-HATU (0,980 g, 2,6 mmol). La disolución se agitó**

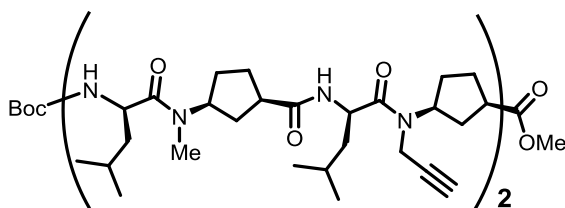
durante 1 h a t.a. y luego se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2x20 mL) y de NaHCO_3 (2x20 mL). A continuación esta disolución se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró a sequedad. Para finalizar, se purificó mediante cromatografía rápida en columna de gel de sílice (7-30% AcOEt/Hexano), lo que permitió obtener el dipéptido **Boc-[D-Leu-*propargil***N-L- γ -Acp]-OMe** como un aceite incoloro. [0,688 g; 82%; R_f = 0,80 (50% AcOEt/Hexano)]. **M.S. (ESI)** [m/z (%): 395 [(M+H) $^+$, 100], 418 [(M+H+Na) $^+$, 95].**



Boc-[D-Leu-*Me*N-L- γ -Acp-D-Leu-*propargil***N-L- γ -Acp]-OMe.** En primer lugar, el dipéptido **Boc-[D-Leu-*propargil***N-L- γ -Acp]-OMe** (0,217 g, 0,55 mmol) se disolvió en una mezcla******

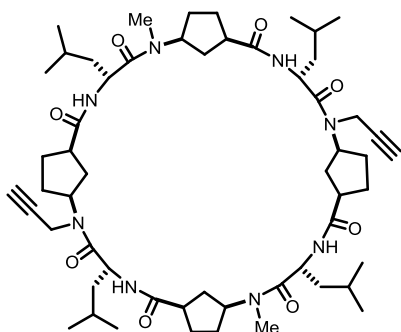
$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3:1, 11 mL) y luego se trató con LiOH (0,066 g, 2,8 mmol). La disolución resultante se agitó a t.a. durante 1 h, y luego el MeOH se evaporó a presión reducida. La fase resultante se acidificó con una disolución acuosa de HCl (5%) hasta pH = 3. Se extrajo la fase acuosa con CH_2Cl_2 (4x15 mL) y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO_4 (anhidro), se filtraron y se concentraron para dar lugar a una espuma blanca de **Boc-[D-Leu-*propargil***N-L- γ -Acp]-OH**. Por otro lado, el dipéptido **Boc-[D-Leu-*Me***N-L- γ -Acp]-OMe** (0,200 g, 0,54 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (2,7 mL) y se trató con TFA (2,7 mL). Tras agitar durante 15 min a t.a., se eliminó el TFA usando el protocolo previamente descrito. A continuación se disolvió el residuo en CH_2Cl_2 seco (2,7 mL) y se añadió DIEA (0,38 mL, 2,2 mmol). Paralelamente, el otro dipéptido con el extremo ácido desprotegido, se disolvió en CH_2Cl_2 seco (2,7 mL) y se trató con DIEA (0,19 mL, 1,1 mmol) y *N*-HBTU (0,246 g, 0,64 mmol). Esta disolución se transfirió a la que contenía el **Boc-[D-Leu-*propargil***N-L- γ -Acp]-OH** y la disolución resultante se agitó bajo atmósfera de argón durante 1 h a t.a. Una vez transcurrido ese tiempo, se lavó la disolución con disoluciones acuosas de HCl (5%, 2x15 mL) y de NaHCO_3 (sat., 2x15 mL). A continuación la disolución******

se secó, se filtró y se concentró a sequedad. Por último se purificó mediante cromatografía rápida en columna de gel de sílice (10-100% AcOEt/Hexano), lo que permitió obtener el tetrapéptido deseado como una espuma blanca. [0,340 g; 96%; R_f = 0,20 (50% AcOEt/Hexano)]. **M.S. (ESI)** [m/z (%): 633 [(M+H)⁺, 100], 655 [(M+Na)⁺, 60].



Boc-[(D-Leu-^{Me}N-L-γ-Acp-D-Leu-^{propargil}N-L-γ-Acp)₂]-OMe. El tetrapéptido **Boc-[D-Leu-^{Me}N-L-γ-Acp-D-Leu-^{propargil}N-L-γ-Acp]-OMe** se separó dos porciones. La primera de ellas (0,165 g, 0,26 mmol) se disolvió en una mezcla MeOH/H₂O (3:1,

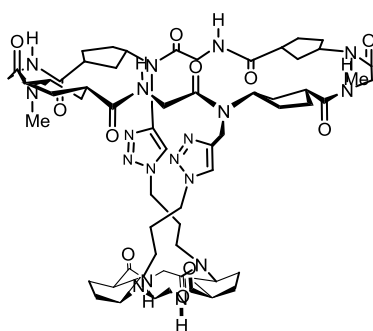
4,2 mL) y se trató con LiOH (0,031 g, 1,31 mmol). Tras agitar al aire durante 1h se concentró el MeOH y se acidificó la disolución resultante con una disolución acuosa de HCl (5%) hasta alcanzar un pH en torno a 2. Se extrajo la fase acuosa con CH₂Cl₂ (4x10 mL) y los extractos combinados se secaron, filtraron y concentraron en el rotavapor a sequedad. Por otro lado, la otra fracción del tetrapéptido (0,160 g, 0,26 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (2,7 mL) y se trató con TFA (2,7 mL). Tras agitar a t.a durante 15 min se eliminó el TFA mediante el protocolo estándar. A continuación, la fracción que había sido tratada con LiOH se disolvió en CH₂Cl₂ seco (2 mL) y se añadió DIEA (0,070 mL, 0,35 mmol) y *N*-HBTU (0,097 g, 0,25 mmol). La otra fracción se disolvió en CH₂Cl₂ seco (2,2 mL) y se trató con DIEA (0,15 mL, 0,70 mmol). Posteriormente se adicionó la primera disolución sobre la segunda y se dejó agitar la mezcla bajo atmósfera de argón durante 2 h a t.a. Luego, se lavó con disoluciones acuosas de HCl (5%, 2x15 mL) y de NaHCO₃ (sat., 2x15 mL). Se secó la disolución con MgSO₄ (anhidro), se filtró y se concentró a sequedad. Por último se purificó mediante cromatografía rápida en columna de gel de sílice (0-5% MeOH/CH₂Cl₂) para dar el octapéptido objetivo en forma de espuma. [0,213 g; 85%; R_f = 0,30 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **M.S. (ESI)** [m/z (%): 567 [(M+Na)²⁺, 100], 1133 [(M+Na)⁺, 55].



c-[(D-Leu-^{Me}N-L-γ-Acp-D-Leu-^{propargil}N-L-γ-Acp)₂]. El octapéptido lineal (0,186 g, 0,16 mmol) se disolvió en una mezcla MeOH/H₂O (3:1, 3,2 mL) y luego se trató con LiOH (0,020 g, 0,82 mmol). La mezcla se agitó durante 1h a t.a. y luego se concentró el MeOH y se acidificó la fase resultante con una disolución acuosa de HCl (5%) hasta pH=2. Posteriormente, se extrajo con CH₂Cl₂ (4x10 mL) y los extractos orgánicos se secaron,

filtraron y concentraron a vacío. A continuación, se disolvió la espuma resultante en CH₂Cl₂ (1,5 mL) y se trató con TFA (1,5 mL). Tras agitar durante 15 min, se eliminó el TFA utilizando el procedimiento habitual. A continuación se disolvió el residuo en CH₂Cl₂ seco

(50 mL) y se trató con DIEA (0,16 mL, 0,30 mmol) y *N*-TBTU (0,096 g, 0,30 mmol). Se dejó agitar esta mezcla bajo atmósfera de argón durante 15 h y tras ese tiempo se añadió nuevamente DIEA (0,16 mL, 0,30 mmol) y *N*-TBTU (0,036 g, 0,12 mmol). Transcurridas 6 h desde la adición, se lavó la disolución con una disolución acuosa de HCl (5%, 2x10 mL) y de NaHCO₃ (2x10 mL). A continuación se secó con MgSO₄ (anhidro), se filtró y se concentró a vacío. Por último, se purificó el residuo mediante cromatografía rápida en columna (0-4% MeOH/CH₂Cl₂) para dar el péptido cíclico como un sólido blanco. [0,099 g; 60%; R_f = 0,47 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H-RMN** (CDCl₃, 500 MHz) δ 8,35 (d, *J* = 9,5 Hz, 1,2 H, NH), 8,26 (d, *J* = 9,5 Hz, 0,8 H, NH), 8,20 (d, *J* = 9,5 Hz, 0,9 H, NH), 8,14 (d, *J* = 9,5 Hz, 1,1 H, NH), 5,10 (m, 4H, Leu-H_α), 4.80 – 4.55 (m, 6H, Acp-H_γ y CH-C≡H), 3,82- (td, *J* = 13,7 y *J* = 2,2 Hz, 2H, CH-C≡H), 3,08 (m y 2s, 10H, Acp-H_α y N-CH₃), 2,21 (t, *J* = 2,4 Hz, 2H, C≡H), 0,95 – 0,78 (m, 24H, Leu-CH₃). **¹³C-RMN** (CDCl₃, 500 MHz). δ 175,4 (C=O), 174,7(C=O), 174,1(C=O), 173,3 (C=O), 80,2 (Q), 72,5 (Q), 55,4 (CH), 54,6 (CH), 47,0 (CH), 46,9 (CH), 43,3 (CH), 42,2 (CH), 41,5 (CH₂), 34,3 (CH₂), 32,6 (CH₂), 31,4 (CH₂), 29,4 (CH₂), 28,3 (CH₂), 28,2 (CH₃), 28,0 (CH₂), 27,7(CH₂), 26,9 (CH₂), 26,7 (CH), 24,8 (CH), 23,5 (CH₃), 22,1 (CH₃). **FT-IR** (293 K, CHCl₃) 1673 (amida I_a), 1632 (amida I_b), 1540 (amida II) cm⁻¹. **H.R.M.S. (ESI)** Masa calculada: 1001,6798. Masa encontrada: 1001,6794.



Bis-ciclopéptido. En primer lugar se disolvieron el **c-[(D-Leu-MeN-L-γ-Acp-D-Leu-propargilN-L-γ-Acp)₂]** (2,5 mg, 0,003 mmol) y el **c-[(D-Leu-³CN₃N-L-γ-Acp)₂]** (1,6 mg, 0,003 mmol) en DMF seca (2,6 mL). A continuación se añadió CuBr (7,5 mg, 0,008 mmol) y *L*-ascorbato sódico en forma de disolución acuosa (0,25 M, 30 μL, 0,008 mmol). La mezcla se agitó bajo atmósfera de argón durante 24 h. Tras ese tiempo, se evaporó la DMF bajo alto vacío y el residuo resultante se redisolvió en CH₂Cl₂ (5 mL) y se lavó con H₂O (2x10 mL). A continuación la fase orgánica se secó con MgSO₄ (anhidro), se filtró y se concentró a presión reducida a sequedad. Tras purificar el residuo en columna cromatográfica (1-10% MeOH/ CH₂Cl₂) se pudo obtener el dímero ciclopeptídico covalente como un sólido blanco. [2,3 mg; 56%; R_f = 0,37 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **H.R.M.S. (ESI)** Masa calculada para el pico mitad: 808,5461. Masa encontrada: 808,5444.

Anexo

Datos espectroscópicos



Anexo: Datos espectroscópicos

